

分子標的薬等薬物療法のファーマコダイナミクス

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特異的チロシンキナーゼの効果を予測するバイオマーカーとそのアッセイ法を探索し、臨床サンプルにおけるその精度、感度、特異性を検証した。EGFR遺伝子の高感度アッセイ法、変異特異的抗体の確立、臨床サンプルを用いた検証をおこなった。血清中の変異型EGFRによる効果予測の可能性を示した

A. 研究目的

チロシンキナーゼ阻害剤の効果を予測するバイオマーカーを探索、検証する。肺癌におけるEGFR遺伝子変異がレトロスペクティブに解析され、EGFR遺伝子変異の状態と生存率、TTPとの関連性について、否定的な結果が発表されている。BR21においてもEGFR遺伝子変異のステータスと生存、TTPに関連性がみとめられなかった。これらの理由として、一部の症例のみの遺伝子解析が可能であったことや、アッセイの質のばらつきが考えられている。現在進行中の前向き試験においては、より確実な遺伝子変異の検出法による標準化が必要である。本研究では比較的非侵襲的に採取できる血清、胸水などの臨床サンプルから、EGFR遺伝子変異を高感度、確実に検査できるようにする。またそれらのサンプルを用いて検査できる新しいバイオマーカーを探索する。

B. 研究方法

(1) 高感度EGFR遺伝子変異法の検証

従来おこなわれているダイレクトシーケンス、RFLP法に加えて、エクソン21の点突然変異並びにエクソン19の欠失型変異の検出をARMS法を用いて比較検討した。対象は、血清、胸水、細胞診サンプルを用いた。

(2) EGFR変異特異的抗体

EGFR変異特異的抗体を用い、EGFR遺伝子変異発現細胞株、臨床検体の変異型EGFRたんぱく質の発現の有無を、ELISA、免疫染色、ウエスタンブロット法で検討した。

C. 研究結果

1) EGFR変異の検索

新しい2つのEGFR遺伝子変異検出法（キャピラリー電気泳動法とScorpion-ARMS法）を導入し、同テクニックを用いて、その感度、特異性などを

検討した。ダイレクトシーケンス法は感度は腫瘍対正常組織の比率において、約1/10なのに対し、この2つの方法の感度は1/1000-1/2000であった。臨床検体を用いたトライアルセットでは、マイクロダイゼクションなしに、EGFR遺伝子変異を確実に捕らえることが可能となり、同法により、胸水、血清サンプルにおけるEGFR遺伝子変異を解析できた。またゲフィチニブ投与前の患者血清中の微量腫瘍由来DNA中の変異型をARMSで検討することにより、変異を有する症例において、治療予後が良好であることが示された。

2) EGFR遺伝子変異特異的抗体の作成

エクソン21のL858R点突然変異特異的抗体を作成した。ELISA法では野生型EGFRに反応せず、変異型L858Rにのみ特異的に反応することが示された。免疫染色ではL858Rを発現している細胞株（11_18細胞）において特異的な染色をしめた。同抗体による組織の解析が簡易型EGFR遺伝子変異検出の1つとなる可能性がある。

3) 新しいバイオマーカー

国立がんセンター中央病院肺内科、金沢大学グループによりおこなわれた臨床試験において、同意を得た臨床サンプルを解析した。末梢血細胞の網羅的遺伝子発現解析により、新しいバイオマーカーを同定した。同遺伝子の発現の有無により、PD例とPD、NC例が判別可能であった。この遺伝子は、EGFR遺伝子変異とは独立した因子であり、人種差を説明しえる可能性がある。

D. 考察

1) EGFR変異の検索

今回検討した、EGFR変異検出技術、キャピラリー電気泳動法とScorpion-ARMS法は、従来の検出法に比べて、その感度、特異性などに優れ、流血中、胸水中の腫瘍由来DNAの遺伝子変異検出をも可能にした。同法が簡便な治療予測法となる可

能性がある。今後、臨床効果との関連性や予測性を前向き臨床試験で検討していく。現在、エクソン19の欠失ならびに21のL858R点突然変異に対するScorpion-ARMS法を検討したが、今後耐性に関わる点突然変異などの系を確立、検証していく。

2) EGFR遺伝子変異特異的抗体の作成

主要な遺伝子変異である、エクソン21のL858R点突然変異特異的抗体は同抗体による組織の解析が簡易型EGFR遺伝子変異検出の1つとなる可能性がある。他の変異型特異的抗体の作成を試みている。

3) 新しいバイオマーカー

末梢血細胞の網羅的遺伝子発現解析により同定した新しいバイオマーカーの予測 検出力を検証する臨床試験を実施していく必要がある。また、同遺伝子の効果を説明しえるメカニズムの解析あるいは、人種差を説明する知見を集積していく必要がある。

E. 結論

EGFR特異的チロシンキナーゼの効果を予測するバイオマーカーとそのアッセイ法を探索し、臨床サンプルにおけるその精度、感度、特異性を検証した。

F. 研究発表

1. Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunitoh H, Tamura T, Kasahara K, and Nishio K. EGFR mutation status in tumor-derived DNA from pleural effusion fluid is a practical source for predicting of gefitinib response. Clin. Cancer Res. (in press)
2. Kimura H, Kasahara K, Shibata K, Sone T, Yoshimoto A, Kita T, Ichikawa Y, Waseda Y, Watanabe K, Shiarasaki H, Ishiura Y, Mizuguchi M, Nakatsumi Y, Kashii T, Kobayashi M, Kunitoh H, Tamura T, Nishio K, Fujimura M, and Nakao S. EGFR mutation of tumor and serum in the gefitinib treated patients with chemotherapy-naïve non-small cell lung cancer. Int. Thoracic Oncol. (in press)
3. Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunitoh H, Tamura T, Kasahara K, and Nishio K. High sensitivity detection of epidermal growth factor receptor mutations in the pleural effusion of non-small cell lung cancer patients. Cancer Sci. (in press)
4. Park S, Shimizu C, Shimoyama T, Takeda M, Kinoshita T, Kohno T, Katsumata N, Kang YK, Nishio K, and Fujiwara Y. Gene expression profiling of ATP binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. Breast Cancer Res. Treat. (in press)
5. Shimoyama T, Hamano T, Natsume T, Koizumi F, Kiura K, Tanimoto M, and Nishio K. Reference profiling of the genomic response induced by an anti-microtubule agent TZT-1027 (Soblidotin) in vitro. Pharmacogenomics J. (in press)
6. Kimura H, Kasahara K, Kawaishi M, Kunitoh H, Tamura T, Holloway B, and Nishio K. Epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer. Clin. Cancer Res. (in press)
7. Sakai K, Arai T, Shimoyama T, Murofushi K, Sekijima M, Kaji N, Tamura T, Saijo N, and Nishio K. Dimerization and the signal transduction pathway of a small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor. FASEB J. 2006; 20: 311-313.
8. Sekine I, Minna JD, Nishio K, Tamura T, and Saijo N. A literature review of molecular markers predictive of clinical response to cytotoxic chemotherapy in patients with lung cancer. Int. Thoracic Oncol. 2006; 1: 31-37.
9. Arai T, Yanagihara K, Takigahira M, Takeda M, Koizumi F, Shiratori Y, and Nishio K. ZD6474 inhibits tumor growth and intraperitoneal dissemination in a highly metastatic orthotopic gastric cancer model. Int. J. Cancer 2006; 118: 483-489.
10. Ando K, Ohmori T, Inoue F, Kadofuku T, Hosaka T, Ishida H, Shirai T, Okuda K, Hirose T, Horichi N, Nishio K, Saijo N, Adachi M, and Kuroki T. Enhancement of sensitivity to tumor necrosis factor α in non-small cell lung cancer cells with acquired resistance to gefitinib. Clin. Cancer Res. 2005; 11: 8872-8879.
11. Nishio K, Arai T, Shimoyama T, Fujiwara Y, Tamura T, and Saijo N. Translational studies for target-based drugs. Cancer Chemother Pharmacol. 2005; 56: s90-s93.
12. Kimura H, Kasahara K, Sekijima M, Tamura T, and Nishio K. Plasma MIP-1 β levels and skin toxicity in Japanese non-small cell lung cancer patients treated with the EGFR-targeted tyrosine kinase inhibitor, gefitinib. Lung Cancer 2005; 50: 393-399.
13. Korfee S, Eberhardt W, Fujiwara Y, and Nishio K. The role of DNA-microarray in translational cancer research. Curr. Pharmacogenomics 2005; 3: 201-216.
14. Shimura M, Saito A, Matsuyama S, Sakuma T, Terui Y, Ueno K, Yumoto H, Yamauchi K, Yamamura K, Mimura H, Sano Y, Yabashi M, Tamasaku K, Nishio K, Nishino Y, Endo K, Hatake K, Mori Y, Ishizaka Y, and Ishikawa T. Element array by scanning X-ray fluorescence microscopy after cis-diamminedichloro-

platinum(II) treatment. Cancer Res. 2005; 65: 4998-5002.

15. Yanagihara K, Takigahira M, Tanaka H, Komatsu T, Fukumoto H, Koizumi F, Nishio K, Ochiya T, Ino Y, and Hirohashi S. Development and biological analysis of peritoneal metastasis mouse models for human scirrhous stomach cancer. Cancer Sci. 2005; 96: 323-332.
16. Nishio M, Ohyanagi F, Horiike A, Ishikawa Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Nishio K, and Horai T. Gefitinib treatment affects androgen levels in non-small-cell lung cancer patients. Br. J. Cancer 2005; 92: 1877-1880.
17. Koizumi F, Shimoyama T, Taguchi F, Saijo N, and Nishio K. Establishment of a human non-small cell lung cancer cell line resistant to gefitinib. Int. J. Cancer 2005; 116: 36-44.
18. 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, and 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. 2005; 23: 1061-1069.

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

G. 知的財産等の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
 1. 高感度簡易測定法を用いた非小細胞肺癌体液検体中の上皮増殖因子受容体（EGFR）遺伝子の体細胞性変異の検出 申請中
 2. 活性型 EGFR 変異体（L858R）特異的抗体（ヒト化モノクローナル Fab 抗体）の開発 申請中
 3. チロシンキナーゼ阻害剤（ゲフィチニブ、イレッサ®）に対する感受性予測因子としての HLA-DQA1 発現測定 申請中
 4. 悪性神経膠腫に高発現する遺伝子の同定 申請中
 5. 特願 2006-004893 Integrin β1、Laminin α3 は中枢神経系原発悪性リンパ腫のマーカーである
 6. 特願 2006-046779 チロシンキナーゼ阻害剤の固形癌に対する感受性を検査する方法及び検査キット
 7. 特願 2005-272764 悪性腫瘍マーカー遺伝子およびその用途
 8. 特願 2005-287168 脳腫瘍患者の予後を予測するための脳腫瘍マーカーおよびその用途
 9. 特願 2005-004893 中枢神経系原発悪性リンパ腫マーカーおよびその用途

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トラスツズマブについて、治療効果予測因子の探索的研究を行い、乳癌の腫瘍特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

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する。

B. 研究方法

1) eTag assay: 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) ADCC: Her2過剰発現乳がんに対するハーセプチン単剤の治療効果は30%前後であり、現在おこなわれているハーセプテストやFISH法の利用だけでは、治療効果の期待できる奏効群を抽出できない。そこで、ハーセプチンの作用機序に関わるといわれている抗体依存性細胞障害活性（ADCC）をハーセプチン治療が行われた乳がん患者において測定し治療効果との相関を検討し、奏効群の層別化を目指す。

（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) eTag assay: 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。

2) H17年度はpreliminary studyとして、同意の得られた乳がん治療患者20例のPBMCを用いてADCC活性を測定し臨床病理学的各因子との関連を検討した。

ADCC活性は化学療法非施行例において、またPBMCにおけるNK細胞の比率が高い患者で有意に高値であった。Her2の発現状況、年齢、ホルモン療法の有無においてはADCC活性との関連が認められなかった。

今後、ハーセプチン治療施行症例におけるADCC活性検索のさらなる蓄積によりハーセプチン治療奏効群の層別化をおこなう予定である。

D. 考察

現在行われているHER-2テストはtrastuzumabに対する非奏効例を同定するためには極めて感度の高い有用な方法であるが、trastuzumabに対する奏効例を同定するには不十分である。Trastuzumabの心毒性、患者のQOLそしてtrastuzumabの費用を考えれば、trastuzumab奏効に関する

効果予測因子の開発は必須であり、臨床的に極めて大きなインパクトをもたらす。そんな中われわれのおこなうeTag assayならびにADCC活性に関する研究は、腫瘍細胞側の要因と宿主側の要因双方からのアプローチにてTrastuzumabの効果予測因子の探索を行うことができる、独創性ならびに新規性の高い研究であるといえる。また、未だ十分に解明されていないtrastuzumabのヒトにおける奏効機序の解明にも役立つものと考えられる。

E. 結論

乳癌を対象に、eTag assay, ADCC活性を中心に、Trastuzumabの新しい効果予測因子としての可能性について検討した。得られた知見はいずれも、臨床応用可能な高感度の効果予測システムへと発展することが期待される。

F. 研究発表

Regular research articles:

- Muta M., Matsumoto G., Nakashima E., Toi M. Mechanical Analysis of Tumor Growth Regression by the Cyclooxygenase-2 Inhibitor, DFU, in a Walker256 Rat Tumor Model: Importance of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Modulation. *Clin Cancer Res.* 12 (1):264-272, 2006.
- Bando H., Weich H., Horiguchi S., Funata N., Ogawa T., Toi M. The association between vascular endothelial growth factor-C, its corresponding receptor, VEGFR-3, and prognosis in primary breast cancer: A study with 193 cases. *Oncology Reports* 15:653-659, 2006.
- Zahidunnabi, M.D., Uchihara J., Terashima K., Honda M., Sata T., Ito M., Fujii N., Uozumi K., Tsukasaki K., Tomonaga M., Kubuki Y., Okayama A., Toi M., Mori N., Yamamoto, N. Efficient intervention of growth and infiltration of primary adult T-cell leukemia cells by an HIV protease inhibitor, ritonavir. *Blood* 107 (2):716-724, 2006.
- Matsumoto G., Muta M., Umezawa K., Suzuki T., Misumi K., Tsuruta K., Okamoto A., Toi M. Enhancement of the caspase-independent apoptotic sensitivity of pancreatic cancer cells by DHMEQ, an NF-kappaB inhibitor. *Int J Oncol.* 27:1247-55, 2005.
- Hiramatsu K., Takahashi K., Yamaguchi T., Matsumoto H., Miyamoto H., Tanaka S., Tanaka C., Tamamori Y., Imajo M., Kawaguchi M., Toi M., Mori T., Kawakita M. N(1),N(12)-Diacetylspermine as a sensitive and specific novel marker for early- and late-stage colorectal and breast cancers. *Clin. Cancer Res.* 11:2986-2990, 2005.
- Saji S., Kawakami M., Hayashi S., Yoshida N., Hirose M., Horiguchi S., 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* 24:4531-4539, 2005.
- Matsumoto G., Namekawa J., Muta M., Nakamura T., Bando H., Tohyama K., Toi M., Umezawa K. Targeting of Nuclear Factor {kappa}B Pathways by Dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel Inhibitor of breast carcinomas: Antitumor and antiangiogenic potential in vivo. *Clin. Cancer Res.* 11:1287-1293, 2005.
- 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.
- Iwata H., Nakamura S., Toi M., Shin E., Masuda N., Ohno S., Takatsuka Y., Hisamatsu K., Yamazaki K., Kusama M., Kaise H., Sato Y., Kuroi K., Akiyama F., Tsuda H., Kurosumi M. Interim Analysis of a Phase II Trial of Cyclophosphamide, Epirubicin and 5-fluorouracil (CEF) Followed by Docetaxel as Preoperative Chemotherapy for Early Stage Breast Carcinoma. *Breast Cancer* 12:99-103, 2005.
- Chow L.W., Loo W.T., Wai C.C., Lui E.L., Zhu L., Toi M. Study of COX-2, Ki67, and p53 expression to predict effectiveness of 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide with celecoxib treatment in breast cancer patients. *Biomed Pharmacother Suppl* 2:298-301, 2005.
- Chow W.C., Cheng C.W., Wong J.L., Toi M. Serum lipid profiles in patients receiving endocrine treatment for breast cancer--the

results from the Celecoxib Anti-Aromatase Neoadjuvant (CAAN) Trial. *Biomed Pharmacother Suppl 2*:S302-305, 2005.

12. Ohno S., Toi M., Kuroi K., nakamura S., Iwata H., Kusama M., Masuda N., Yamazaki K., Hisamatsu K., Sato Y., Takatsuka Y., Shin E., Kaise H., Kurozumi M., tsuda H., Akiyama F. Update results of FEC followed by docetaxel neoadjuvant trials for primary breast cancer. *Biomed Pharmacother Suppl 2*:S323-324, 2005.

Reviews:

1. Kuroi K., Toi M., Tsuda H., Kurosumi M., Akiyama F. Issues in the Assessment of the Pathologic Effect of Primary Systemic Therapy for Breast Cancer. *Breast Cancer 13 (1)*: 38-48, 2006.
2. Kuroi K., Toi M. A current perspective on the use of a weekly docetaxel dosing schedule in breast cancer. www.siicsalud.com, 2006.
3. Kondo, M., Toi M. Cost-effective treatment options in first-line therapy for advanced breast cancer in Japan. *Expert Review of Anticancer Therapy 6 (2)*:197-204, 2006.
4. Albain K.S., Salazar Jde L., Pienkowski T., Aapro M., Bergh J., Caleffi M., Coleman R., Eiermann W., Icli F., Pegram M., Piccart M., Snyder R., Toi M., Hortobagyi G.N. Reducing the global breast cancer burden: the importance of patterns of care research. *Clin Breast Cancer 6 (5)*:412-420, 2005.
5. Saji S., Hirose M., Toi M. Clinical significance of estrogen receptor beta in breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol. 7*: 21-26, 2005.
6. Toi M., Horiguchi K., Bando H., Saji S., Chow L.W.C. Trastuzumab: updates and future issues. *Cancer Chemother Pharmacol. 56 (Suppl 1)*:94-99, 2005.
7. Gasparini G., Longo R., Toi M., Ferrara N. Angiogenic inhibitors: a new therapeutic strategy in oncology. *Nat Clin Pract Oncol. 2 (11)*:562-577, 2005.
8. Toi M., Takebayashi Y., Chow L.W. Translational research in breast cancer. *Breast Cancer. 12 (2)*:86-90, 2005.

9. Nakanishi C., Toi M. Nuclear factor k-B inhibitors as sensitizer of anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer 5*:297-309, 2005.
10. Toi M., Rahman M.A., Bando H., Chow L.W.C. Role of thymidine phosphorylase /PD-ECGF in cancer biology and treatment. *Lancet Oncol. 6*:158-166, 2005.
11. Chow L.W., Loo W.T., Toi M. Current directions for COX-2 inhibition in breast cancer. *Biomed Pharmacother Suppl 2*: 281-284, 2005.
12. Chow L.W., Toi M. Translational research in oncology comes timely. *Biomed Pharmacother Suppl 2*: 263, 2005.
13. Kuroi K., Toi M., Tsuda H., Kurosumi M., Akiyama F. Unargued issues on the pathological assessment of response in primary systemic therapy for breast cancer. *Biomed Pharmacother Suppl 2*: 387-392, 2005.
14. Dewan M.Z., Terunuma H., Ahmed S., Ohsa K., Takada M., Tanaka Y., Toi M., Yamamoto N. Natural killer cells in breast cancer cell growth and metastasis in SCID mice. *Biomed Pharmacother Suppl 2* : 375-379, 2005.
15. Toi M., Bando H., Weich H.A. Vascular endothelial growth factor and its relationships with endogenous inhibitors in a breast cancer microenvironment manipulated by hormonal therapy: a hypothetical consideration. *Biomed Pharmacother Suppl 2*: 344-347, 2005.
16. Ueno T., Toi M., Linder S. Detection of epithelial cell death in the body by cytokeratin 18 measurement. *Biomed Pharmacother. Suppl 2*:S359-362, 2005.

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

新規アポトーシス誘導剤ETB(epolactaene tertiary butyl ester)およびEpo(epolactaene)の結合蛋白質の1つとして分子シャペロンHsp60(chaperonin)を見出し、ETB/EpoがHsp60の機能を抑制することを明らかにした。一方、細胞周期阻害剤(G1期停止剤)phosmidosine-Etの分子標的がプロリルtRNA合成酵素(ProRS)であることを明らかにした。

A. 研究目的

近年のがん細胞生物学の進展により、アポトーシスや細胞周期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、アポトーシスや細胞周期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

昨年度、epolactaeneおよびphosmidosineの構造活性相関研究の結果、それぞれ、有望なリード化合物としてETBおよびphosmidosine-Etを見出した。そこで本年度は、ETB/EpoがHsp60の機能に与える影響を詳細に検討するとともに、phosmidosine-Etの標的分子解明のための基盤研究を行った。

1. リンゴ酸脱水素酵素およびクエン酸合成酵素を基質としたHsp60の分子シャペロン活性に与えるETB/Epoの影響を検討した。
2. ETB/EpoのHsp60への結合様式をHsp60変異体を作成して詳細に検討した。
3. v-src^{1s}-NRK細胞の粗抽出液を酵素源として、各種アミノアシルtRNA合成酵素反応に与えるphosmidosine-Etの影響を検討した。
4. ヒト型リコンビナント・プロリルtRNA合成酵素(ProRS)の酵素活性に与えるphosmidosine-Etの影響を検討した。

(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. ETB/Epoは、リンゴ酸脱水素酵素およびクエン酸合成酵素を基質としたHsp60の分子シャペロン活性を濃度依存的に抑制し、この抑制効果は系内への過剰なHsp60の添加によりキャンセルされた。一方、ETB/Epoの不活性型類縁化合物は、Hsp60の機能を抑制しなかった。
2. ETB/Epoは、Hsp60の442番目のシステイン残基(Cys⁴⁴²)を介して結合し、分子シャペロン活性を抑制した。ETB/EpoのHsp60への結合は、N-エチルマレイイミドの前処理によってキャンセルされた。
3. v-src^{1s}-NRK細胞の粗抽出液を酵素源として、phosmidosine-Etの各種アミノアシルtRNA合成酵素反応に与える影響を検討した結果、phosmidosine-EtはプロリルtRNA合成酵素(ProRS)反応を特異的に抑制した。
4. Phosmidosine-Etは、ヒト型リコンビナントProRSの酵素活性を顕著に抑制した。一方、phosmidosine-Et分子内のL-プロリン部分をD-プロリンあるいはL-イソロイシンに置換した不活性誘導体は、ProRS活性を抑制しなかった。

D. 考察

1. TB/Epoの標的蛋白質の1つがHsp60である事を明らかにしたことは、ETB/EpoがHsp60の機能解明のための有力なツールになるとともに、Hsp60が新しいがん化学療法の分子標的となりうる可能性が示唆され、今後の発展性が期待される。

2. Phosmidosine-Etの標的分子がプロリルtRNA合成酵素(ProRS)であることが示唆され、今後両者の相互作用等を検討予定である。

E. 結論

新規アポトーシス誘導剤ETB/Epoの標的蛋白質の1つとして分子シャペロンHsp60(chaperonin)を見出し、ETB/EpoがHsp60の機能を抑制することを明らかにした。一方、細胞周期阻害剤(G1期停止剤)phosmidosine-Etの分子標的がプロリルtRNA合成酵素(ProRS)であることを明らかにした。

F. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. Nagumo, Y., Takeya, H., Shoji, M., Hayashi, Y., Dohmae, N., and Osada, H. Epolactaene binds human Hsp60 Cys442 resulting in the inhibition of chaperone activity. *Biochem. J.* 2005; 387: 835-840.
2. Mitsui, T., Miyake, Y., Takeya, H., Hayashi, Y., Osada, H., Kataoka, T. RKTS-33, an epoxycyclohexenone derivatives that specifically inhibits Fas ligand-dependent apoptosis in CTL-mediated cytotoxicity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2005; 69, 1923-1928.
3. Takeya, H., Onose, R., Koshino, H., Osada, H. Epoxytwinol A, a novel unique angiogenesis inhibitor with C2 symmetry, produced by a fungus. *Chem. Commun.* 2005; 2005: 2575-2577.
4. Shoji, M., Uno, T., Takeya, H., Onose, R., Shiina, I., Osada, H., Hayashi, Y. Enantio- and diastereo- selective total synthesis of EI-1941-1, -2, and -3, inhibitors of interleukin-1 β converting enzyme and biological properties of their derivatives. *J. Org. Chem.* 2005; 70: 9905-9915.
5. Yamaguchi, J., Takeya, H., Uno, T., Shoji, M., Osada, H., Hayashi, Y. Determination by asymmetric total synthesis of the absolute configuration of lucilactaene, a cell cycle inhibitor in p53-transfected cancer cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005; 44: 3110-3115.
6. Hayashi, Y., Shoji, M., Mukaiyama, T., Gotoh, H., Yamaguchi, S., Nakata, M., Takeya, H., Osada, H. First total

synthesis of synerazol, an antifungal antibiotic, and determination of its absolute stereochemistry. *J. Org. Chem.* 2005; 70: 5643-5654.

7. Shoji, M., Imai, H., Mukaida, M., Sakai, K., Takeya, H., Osada, H., Hayashi, Y. Total syntheses of epoxyquinols A, B, C, and epoxytwinol A and the reactivity of a 2H-pyran derivatives as the diene component in the Diels-Alder reaction. *J. Org. Chem.* 2005; 70: 79-91.
8. Kwon, H.-J., 掛谷秀昭. 新しい血管新生阻害剤におけるケミカルゲノミクス. 蛋白質核酸 酵素. 2005; 50: 1056-1062.

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

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

VEGFRチロシンキナーゼ阻害剤投与前後の末梢血単核球遺伝子発現の解析において、血中VEGF濃度依存的変動を示す47遺伝子を同定し、臨床効果と相関する可能性を示した。また、血中薬物濃度依存的変動を示す35遺伝子を同定、VEGF依存的変動遺伝子とは作用シグナルが異なる可能性が示された。末梢血単核球が、VEGFシグナル阻害剤の薬理学的作用のサロゲートマーカーとなりうる可能性がある。

A. 研究目的

本研究の目的は、分子標的薬の抗腫瘍効果規定因子を決定し、臨床における分子標的薬のサロゲートマーカーの選択とその有用性を証明するための臨床付随研究を実施することである。そのためには、第一段階として分子標的薬の生体内における作用機序、薬力学的効果を明らかにし、生物学的効果の実証をおこなう必要がある。その発展研究として、分子標的薬の臨床効果の指標となるpharmacodynamic markerの同定、対象疾患および併用薬剤の選択について理論的アプローチを行う。

B. 研究方法

薬剤の生体内での薬力学的効果の証明、作用機序及び標的因子の同定を行う目的で、まず、臨床試験における分子標的薬および抗癌剤の患者末梢血単核球における薬物投与前後の遺伝子発現変動をcDNAマイクロアレイを用いて解析した。対象は、固形患者を対象としたVEGFRチロシンキナーゼ阻害剤TSU-68の臨床第I相試験参加14名で解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は末梢血単核球の遺伝子発現に関する研究であり、解析対象は遺伝子の発現変動解析に限りゲノム解析は行わない。よって、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の対象ではないが、その趣旨を踏まえた対応を行った。個人の識別につながる情報は、個人情報管理者により管理され、連結した遺伝子発現情報が第三者に渡ることはない。また、検体に対応する個人識別情報は6文字の英数字に変換し、症例登録以後は、検体はすべて符号化された番号のみで取り扱い、情報管理に留意し、検体の提供者およびその家族への不利益を最小限に留めるよう配慮した。

C. 研究結果

TSU-68はVEGFRをターゲットとした、TK阻害化合物である。この薬剤による治療前後における患者末梢血単核球での遺伝子発現変動を、薬物血中濃度との相関解析によって分析した。2つの薬剤内服スケジュールの異なる、独立した2つの試験をvalidationモデルに使い、患者個々のPK値と薬剤投与前後の遺伝子発現比をSpearman rank correlation analysis ($R>0.6$)にて解析した。その結果、サイトカイン、接着因子関連の遺伝子の一群（35遺伝子）が同定された。また、その遺伝子群内の同定されたcadherin-11, Her3, CIP3Kは、SU11248 (TSU-68 derivative) の治療前後腫瘍サンプルにおいて、蛋白レベルの発現が増大している事が臨床サンプルにおいても報告されており、リンパ球を用いた解析により、腫瘍内薬理学的効果を推定するサロゲートマーカーが同定できる可能性を示している。一方、患者血中VEGF濃度変動と相関する遺伝子の解析にて、VEGFR, MMP等のVEGF/VEGFRシグナル依存の増殖、転移関連遺伝子（47遺伝子）が相関変動していることが明らかになった。抗腫瘍効果との比較解析により、これらの遺伝子変動は、治療効果PDと相関している可能性が示され、VEGFシグナル阻害薬の効果評価マーカーとしても、患者末梢血単核球が有用である事を示した。これらの遺伝子をVEGFシグナルpathway上にて解析したところ、VEGFとTSU-68の作用シグナルがMAPとAKTと異なっている可能性が示された。

D. 考察

今回用いた手法は、血管新生阻害薬という、臨床レベルで評価が困難であった薬剤において、リンパ球を介して生物学的作用をモニターする事が可能である事を示した。VEGFRをターゲットとした抗体治

療が臨床効果を認めているなか、TK阻害剤においては、VEGFR阻害による臨床効果は明らかではなく、その薬力学的作用のバイオマーカーを同定した今回の研究結果は、その臨床開発において価値が大きいものであり、今後のVEGFシグナル阻害剤の臨床開発に応用できる成果であり、今後、蛋白レベルにおいて、検証付随研究を行っていく予定である。

E. 結論

血中VEGF濃度依存的に変動を示す、47遺伝子を同定し、血管新生関連遺伝子の発現変化が、臨床効果と相関している可能性を示した。

TSU-16濃度依存的に発現変動を示す35遺伝子を同定、VEGF依存的変動遺伝子と比較し、作用シグナルが異なる可能性を示した。

末梢血単核球が、VEGFシグナル阻害剤の薬理学的効果のサロゲートマーカーになり得る事を示した。

F. 研究発表

1. Yamada Y, Yamamoto N, Shimoyama T, Horiike A, Fujisaka Y, Takayama K, Sakamoto T, Nishioka Y, Yasuda S, Tamura T. Phase I pharmacokinetic and pharmacogenomic study of E7070 administered once every 21 days. *Cancer Sci.* 2005; 96(10):721-8.
2. Yamazaki S, Sekine I, Matsuno Y, Takei H, Yamamoto N, Kunitoh H, Ohe Y, Tamura T, Kodama T, Asamura H, Tsuchiya R, Saijo N. Clinical responses of large cell neuroendocrine carcinoma of the lung to cisplatin-based chemotherapy. *Lung Cancer.* 2005; 49(2):217-23.
3. Takano T, Ohe Y, Sakamoto H, Tsuta K, Matsuno Y, Tateishi U, Yamamoto S, Nokihara H, Yamamoto N, Sekine I, Kunitoh H, Shibata T, Sakiyama T, Yoshida T, Tamura T. Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations and Increased Copy Numbers Predict Gefitinib Sensitivity in Patients With Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23(28):6829-37.
4. Sekine I, Tamura T. Phase I clinical trials in oncology. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352(23):2451-3.
5. 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.* 2005; 23(6):1061-9.

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

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 中川 和彦 近畿大学医学部腫瘍内科 助教授

研究要旨

アポトーシス阻害蛋白のひとつであるSurvivinを標的とした新しいがん治療法を開発する。Survivinの発現を抑制する新規抗がん剤を臨床開発するとともに、従来の抗がん剤との併用療法、放射線療法との併用療法を模索、検討する。

A. 研究目的

①survivinの発現を抑制することにより、現在使用されている抗がん剤や放射線治療をより効果的に使用することが可能となり、結果として治療成績を向上させることが期待される。本年度は、抗がん剤耐性に大きく影響を及ぼしていると考えられるp53遺伝子の発現とsurvivinの発現が間接的に関連していることを証明する。つまり、p53遺伝子変異または不活化がシスプラチンやアドリアマイシン、放射線治療の耐性と関連しているといわれる。この耐性機構に間接的にsurvivinの発現調節が関連していれば、survivinの発現を人為的に調節することにより抗がん剤耐性を克服する可能性が示唆される。このことは、survivinの蛋白発現を抑制する小分子化合物を開発することができれば、その薬剤を抗がん剤や放射線と併用することにより有効な治療法を開発することが可能となる。②YM155の臨床使用の第I段階として重要である。また、人体内でYM155がsurvivinの蛋白発現を抑制することを証明することは今後のYM155の臨床試験を計画する上で、最も重要な意味を持つ。

B. 研究方法

①Survivinおよびその発現に関与する生物学的因子のsiRNAを作成し、その発現を調整することにより抗がん剤および放射線の感受性変化を調べる。p53遺伝子およびSurvivinのsiRNAを作成し、p53遺伝子異常を伴う肺がん細胞株と野生型肺がん細胞株におけるSurvivin遺伝子発現に与える影響を観察し、加えてアドリアマイシン、紫外線に対する感受性の変化を調べた。②Survivin発現の抑制作用を有するYM155の臨床第I相試験を実施し、その最大耐用量、推奨容量および容量制限毒性を求める。また、生体内におけるYM155によるsurvivin発現抑制作用を臨床的

に証明し、本薬剤が生体内においても開発コンセプトを臨床的に実現できる可能性を示す。

（倫理面への配慮）

臨床試験は近畿大学医学部の倫理委員会で承認されたうえで本邦で定めるGCPに準拠して実施されている。また、文書による同意を得ている。

C. 研究結果

①Survivinの遺伝子発現を抑制することにより細胞増殖を抑制した。また、同時にアドリアマイシン感受性と紫外線感受性を増強することが示された。②YM155の臨床第I相試験は、現在、第4投与レベルを終了、第5投与レベルを登録中である。海外でDLTとして発現を認めている腎臓障害が10.6 mg/m²/dayで認められた。また、高投与量において明らかな感染を伴わない一過性の発熱、CRPの上昇、肝機能異常を認めている。

D. 考察

Survivinの遺伝子発現を抑制することにより抗腫瘍効果、抗がん剤や放射線との併用効果を期待することができる。YM155のMTDが決定した場合、単剤での抗腫瘍効果とともに抗がん剤との併用の臨床試験が期待される。

E. 結論

Survivinの遺伝子発現を抑制することにより抗腫瘍効果、抗がん剤や放射線との併用効果を期待することができる。

F. 研究発表

1. Matsui K, Hirashima T, Nitta T, Kobayashi M, Ogata Y, Furukawa M, Kudoh S, Yoshimura N, Mukohara T, Yamauchi S, Shiraishi S, Kamoi H, Negoro S, Takeda K, Nakagawa K, Takada M, Yana T, and

- Fukuoka M. A phase I/II study comparing regimen schedules of gemcitabine and docetaxel in Japanese patients with stage IIIB/IV non-small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35: 181-187.
2. Ohe Y, Negoro S, Matsui K, Nakagawa K, Sugiura T, Takada Y, Nishiwaki Y, Yokota S, Kawahara M, Saijo N, Fukuoka M, and Ariyoshi Y. Phase I-II study of amrubicin and cisplatin in previously untreated patients with extensive-stage small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2005; 16: 430-436.
 3. Yoshimura N, Kudoh S, Kimura T, Mitsuoka S, Matsuura K, Hirata K, Matsui K, Negoro S, Nakagawa K, Fukuoka M. EKB-569, a new irreversible epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with clinical activity in patients with non-small cell lung cancer with acquired resistance to gefitinib. *Lung Cancer* 2005; 51: 363-368.
 4. Yonesaka K, Tamura K, Kurata T, Satoh T, Ikeda M, Fukuoka M, Nakagawa K. Small interfering RNA targeting survivin sensitizes lung cancer cell with mutant p53 to adriamycin. *Int J Cancer* 2006; 812-820.
 5. Yamamoto N, Tsurutani J, Yoshimura N, Asai G, Moriyama A, Nakagawa K, Kudou S, Takada M, Minato Y, Fukuoka M. Phase II study of weekly paclitaxel for Relapsed and refractory small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2006 ; 777-782.
 6. Okamoto I, Araki J, Suto R, Shimada M, Nakagawa K, Fukuoka M. EGFR mutation in gefitinib-responsive small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2006 in press.
 7. Asai G, Yamamoto N, Kurata T, Tamura K, Uejima H, Nakagawa K, Fukuoka M ; Phase I and Pharmacokinetic Study of Combination Chemotherapy Using Irinotecan and Paclitaxel in Patients .*Journal of Thoracic Oncology* 2006 in press.
 8. Yamamoto N , Nakagawa K , et al ; 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. *CANCER* 2006 in press

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

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

分子標的薬を含む薬物療法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：

がんにおいて、イレッサ（ゲフィチニブ）の効果を制御する標的として EGF 受容体変異以外に HER2/ HER3 を、さらに YB-1 の核内局在が P-糖蛋白質発現以外に薬剤耐性や悪性形質を担う標的遺伝子発現と相関するか否かを検討した。さらに炎症に応答するがん血管新生誘導に関与する標的遺伝子と制御について検討した。

A. 研究目的

分子標的薬剤や他の抗がん剤の最適化ならびに、がん創薬研究に貢献できる新しい標的を提示する。すなわち、

- 1.がん治療薬の効果を制御する分子標的に関して、がんでの発現特異性、発現様式や機能を明らかにする。と同時に臨床応用可能な標的を提示する。
- 2.がん間質の血管新生やリンパ管新生に関して、炎症応答と深く関連する分子機序や標的細胞を明らかにし、がん悪性化に寄与する標的を提示していく。

B. 研究方法

1.抗がん剤治療効果を制御する分子標的：

(1)Y-ボックス結合タンパク-1(YB-1)の核内移行への Akt 活性化の関与を、細胞質と核画分を用いウエスタンブロット法や共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫細胞染色法で解析する。さらに YB-1 によって発現が制御される遺伝子群の発現を同定するために、YB-1 siRNA 処理と非処理群間でマイクロアレイ法や RT-PCR 法で同定する。

(2)ヒト乳癌、卵巣癌、胃癌、大腸癌、膵癌などの病理学材料を用いて YB-1 の細胞内局在と関連タンパク質の発現との相関の有無を免疫組織染色法で検討する。

2.がんの悪性化を促進する間質応答に関与する分子標的や標的細胞：

(1)がん転移抑制や分化と関連する遺伝子 Cap43/ NDRG1 の乳癌や膵癌における役割を検討するために、cDNA 導入や siRNA で発現を変化させ細胞株を樹立した。

(2)血管新生活性をみるためにマウス角膜法を用いた。さらにビスホスホネート系薬剤をリポソーム化した薬剤を用い、生体内のマクロファージ数を減少させ、血管新生の誘導能に与える効果を測定した。

（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.抗がん剤治療効果を制御する分子標的に関して：

(1)YB-1 遺伝子のノックアウト細胞においてシスプラチンやマイトマイシン C などの抗がん剤感受性が有意に上昇していた。YB-1 の P-糖蛋白質発現上昇への関与以外に、DNA 障害の修復にも関与することが示唆された。

(2)ヒト軟部腫瘍における P-糖蛋白質の発現は YB-1 の核内局在と相関する以外に p53 の核内局在とも相関していた。

(3)ヒト肺癌細胞において HER2/ HER3 のヘテロダイマー形成ならびに P85 α の結合がイレッサの感受性に関与していた。

2.がんの悪性化を促進する間質応答に関与する分子標的とマクロファージ：

(1)炎症性サイトカイン IL-1 β で誘導される血管新生には、シクロオキシゲナーゼ 2 の活性化の他に、がん細胞からの VEGF や IL-8 などの血管新生促進因子やマクロファージから産生される促進因子の関与が観察された。さらに、マクロファージの特異的標的薬剤 ビスホスホネート・リポソームで有意に阻害された。

(2)抗多発性骨髄腫薬剤として研究が進められつつある Am80(タミバロテン)が血管内皮細胞の VEGFR のキナーゼを阻害し VEGF 誘導の血管新生を阻害した。

(3)Cap43/ NDRG1 の発現が乳癌細胞においてエストラジオールで低下し、タモキシフェンで上昇した。抗

ホルモン抗がん剤の効果の判定に有用な標的になる可能性を示した。他方、膀胱癌細胞においては、Cap43の発現はがん細胞の運動/浸潤能さらに血管新生能に密接に関与することを見出しつつある。

D. 考察

YB-1の発現や核内局在は、P-糖蛋白質の発現のみならず、広くがんの耐性を担う分子標的として提示することができた。YB-1の発現レベルや核内局在がその他のがんの悪性形質を担う遺伝子群の発現と相関するか否かを検討することによって、YB-1のネットワークシステムが薬物療法の最適化にむけて貢献できると確信している。他方、炎症性サイトカイン、シクロオキシゲナーゼ2、NF- κ B またマクロファージなどの炎症関連因子ががんの進行や悪性形質の獲得に深く関与していることが注目されている。我々はCap43/ NDRG1 と腫瘍関連マクロファージについて研究を進め、血管新生などのがんの間質応答の制御を介した治療戦略を考案していくことができると考えている。

E. 結論

1. YB-1の核内局在は、P-糖蛋白質の発現だけでなくCXCR4やMVP/LRPなどの発現とも相関した。
2. EGFRの突然変異以外に、HER2/HER3のヘテロダイマー形成やP85 α の結合もまたイレッサの感受性を制御した。
3. Cap43/ NDRG1の発現は乳癌においてホルモン受容体と、膀胱癌においては血管新生能と緊密に相関した。
4. 腫瘍関連マクロファージの浸潤は血管新生の誘導に関わっていた。

F. 健康危機情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuwano M, Basaki Y, Kuwano T, Nakao S, Oie S, Kimura Y N, 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" Nova Science Publishers Inc. New York 2005; 157-170.
2. 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* 2005; 5: 15-27.

3. Yokoyama G, Fujii T, Tayama K, Yamana H, Kuwano M, and Shirouzu K. PKC δ and MAPK mediate G₁ arrest induced by PMA in SKBR-3 breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 327: 720-726.
4. 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* 2005; 114: 854-862.
5. 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.* 2005; 65: 4253-4260.
6. Sanda T, Kuwano T, Nakao S, Iida S, Ishida T, Komatsu H, Shudo K, Kuwano M, Ono M, and Ueda R. Antimyeloma effects of a novel synthetic retinoid Am80 (Tamibarotene) through inhibition of angiogenesis. *Leukemia* 2005; 19: 901-909.
7. 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.* 2005; 230 : 33-46.
8. Nakao S, Kuwano T, Tsutsumi-Miyahara C, Ueda S, Hamano S, Sonoda K, Saijo Y, Nukiwa T, Ishibashi T, Kuwano M, and Ono M. Infiltration of COX2-expressing macrophage is prerequisite for IL-1 β induced neovascularization and tumor growth. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 2979-2991.
9. Fujii T, Nakamura A M, Yokoyama G, Yamaguchi M, Tayama K, Miwa K, Toh U, Kawamura D, Shirouzu K, Yamana H, Kuwano M, and Tsuda H. Antineoplaston induces G₁ arrest by PKC α and MAPK pathway in SKBR-3 breast cancer cells. *Oncology Reports* 2005; 14: 489-494.
10. Sata R, Ohtani H, Tsujimoto M, Murakami H, Koyabu N, Nakamura T, Uchiumi T, Kuwano M, Nagata H, Tsukimori K, Nakano H, and Sawada Y. Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta. *J. Pharmacol. Expt.*

Therapeut. 2005; 315:888-895.

11. Fotovati A, Fujii T, Yamaguchi M, Sirouzu K, Ono M, Yamana H, and Kuwano, M. 17 β -Estradiol induces downregulation of Cap43/NDRG1/Drg-1, a putative differentiation related and metastasis suppressor gene, in human breast cancer cells. *Clinic.Cancer Res.* in press.

2.学会発表

1. Ono, M., Nakao, S., Kuwano, T., Ueda, S., Kimura, N. Y., Oie, S. and Kuwano, M. The control of tumor growth and angiogenesis by inflammatory cytokines and infiltration of macrophages in tumor microenvironment. 96th AACR Annual Meeting (第96回アメリカ癌学会) (ポスター) 2005 (Anaheim, California).
2. Maruyama, Y., Oie, S., Basaki, Y., Hosoi, F., Ono, M., Tanaka, S., Kage, M., Aoyagi, S., Kinoshita, H. and Kuwano, M. Low expression of the metastasis-suppressor gene Cap34 is associated with poor prognosis in pancreatic cancer. 96th AACR Annual Meeting (第96回アメリカ癌学会) (ポスター) 2005 (Anaheim, California).
3. 丸山祐一郎、大家真治、馬崎雄二、細井文仁、小野眞弓、鹿毛政義、原雅雄、白水雄、青柳成明、木下壽文、桑野信彦。転移抑制遺伝子 Cap43 の発現は膵癌の悪性形質獲得の分子標的である。第105回日本外科学会定期学術集会 2005年5月13日(名古屋)
4. 細井文仁、丸山祐一郎、大家真治、小野眞弓、木下壽文、桑野信彦。Cap43/NDRG1/Drg-1/Rit42 は膵癌、肝癌及び乳癌の転移や悪性形質獲得の分子標的となるか? 第14回日本がん転移学会総会 2005年6月2~3日(大阪)
5. 馬崎雄二、大家真治、細井文仁、丸山祐一郎、寺田忠史、小野眞弓、桑野信彦。肝細胞癌の増殖に關与する IGF シグナルの役割と臨床的意義。第9回がん分子標的治療研究会 (ポスター) 2005年6月30~7月1日(京都)
6. 上田秀一、馬崎雄二、桑野信彦、小野眞弓。肝癌細胞で誘導される血管新生のイレッサ (Gefitinib) による阻害と機序。第9回がん分子標的治療研究会 (ポスター) 2005年6月30~7月1日(京都)
7. 平田晃、細井文仁、上田秀一、内藤誠二、桑野信彦、小野眞弓。EGF レセプターファミリー-HER2 発現は非小細胞肺癌の Gefitinib (Iressa) 感受性を變化させる。第9回がん分子標的治療研究会 (シンポジウ

ム) 2005年6月30~7月1日(京都)

8. 大家真治、細井文仁、丸山祐一郎、馬崎雄二、小野眞弓、桑野信彦。ヒト肝癌細胞におけるインターフェロン α と5-FU併用相乗効果を制御する分子標的。第9回がん分子標的治療研究会 (ポスター) 2005年6月30~7月1日(京都)
9. 丸山祐一郎、細井文仁、馬崎雄二、大家真治、藤井輝彦、小野眞弓、木下壽文、桑野信彦。膵癌と乳癌における悪性形質獲得の分子標的としての Cap43/NDRG-1/drg-1/rit43 の発現。第9回がん分子標的治療研究会 (ポスター) 2005年6月30~7月1日(京都)
10. 内海健、和泉弘人、桑野信彦、河野公俊。YB-1 (Y-box 結合タンパク) と B23 との結合と翻訳制御。第64回日本癌学会総会 (ワークショップ) 2005年9月14~16日(札幌)
11. 中川真宗、小田義直、江口孝志、相島慎一、八尾隆志、細井文仁、大家真治、小野眞弓、桑野信彦、恒吉正澄。ヒト癌における Class I HDAC の発現状況。第64回日本癌学会総会 (ワークショップ) 2005年9月14~16日(札幌)
12. 古賀浩徳、セルペンディラン カルパイヤ、上野隆登、鳥村拓司、矢野博久、神代正道、桑野信彦、佐田通夫。シソ種子抽出ルテオリンによる肝癌細胞アポトーシス誘導の分子機序。第64回日本癌学会総会 (ワークショップ) 2005年9月14~16日(札幌)
13. 鳥村拓司、上野隆登、古賀浩徳、橋本修、安東栄治、長岡栄、佐田通夫、矢野博久、神代正道、桑野信彦、中島恵美。肝細胞癌の化学療法における新しい drug delivery system の開発。第64回日本癌学会総会 (ワークショップ) 2005年9月14~16日(札幌)
14. 丸山祐一郎、小野眞弓、細井文仁、大家真治、馬崎雄二、木下壽文、桑野信彦。膵癌における悪性形質獲得の標的としての Cap43/NDRG1 の発現とその機能。第64回日本癌学会総会 (ワークショップ) 2005年9月14~16日(札幌)
15. 木村祐介、中尾新太郎、上田秀一、桑野隆史、ベレツキビボルカ、大家真治、高森信三、桑野信彦、小野眞弓。炎症性サイトカイン IL-1 β 依存性の癌進展とマクロファージの関与。第64回日本癌学会総会 (ワークショップ) 2005年9月14~16日(札幌)
16. 細井文仁、大家真治、小野眞弓、丸山祐一郎、馬崎雄二、矢野博久、神代正道、桑野信彦。Cap43/NDRG1 の発現は肝癌における分化マーカーとなるか否か? 第64回日本癌学会総会 (ポスター) 2005年9月14~16日(札幌)
17. フォトバティアーバス、藤井輝彦、小野眞弓、山

名秀明、桑野信彦. 乳癌細胞におけるタモキシフェン、ハーセプチン、ドキソルビシンによる Cap43 の発現制御. 第 64 回 日本癌学会総会 (ポスター) 2005 年 9 月 14~16 日 (札幌)

18. 大家真治、細井文仁、丸山祐一郎、馬崎雄二、鳥村拓司、矢野博久、上野隆登、小野眞弓、神代正道、桑野信彦. インターフェロン α と 5-FU 併用のヒト肝癌細胞に対する相乗効果を制御する分子機序. 第 64 回 日本癌学会総会 (ポスター) 2005 年 9 月 14~16 日 (札幌)

19. 橋本修、古賀浩徳、鳥村拓司、上野隆登、佐田通夫、桑野信彦. CyclinD を介した Wee1 inhibitor (PD0166285) の melanoma 細胞増殖抑制効果. 第 64 回 日本癌学会総会 (ポスター) 2005 年 9 月 14~16 日 (札幌)

20. 馬崎雄二、相島慎一、Abbas Fotovati、大家真治、細井文仁、丸山祐一郎、小田義直、矢野博久、神代正道、寺田忠史、小野眞弓、恒吉正澄、桑野信彦. IGFBP-3 による肝細胞癌の IGF 依存性増殖の制御と臨床的意義. 第 64 回 日本癌学会総会 (ポスター) 2005 年 9 月 14~16 日 (札幌)

21. 上田秀一、馬崎雄二、向坂彰太郎、桑野信彦、小野眞弓. イレッサ (Gefitinib) による肝癌細胞誘導の血管新生阻害と PTEN/Akt シグナルの関与. 第 64 回 日本癌学会総会 (ポスター) 2005 年 9 月 14~16 日 (札幌)

22. 桑野信彦. Development of Novel and Useful Therapeutic Strategies against Human Cancers from Bench to Bed Side. Asian Symposium for Pharmaceutical Sciences 2006 年 1 月 25~26 日 (福岡)

23. 桑野信彦. 分子標的治療の将来展望ーがん血管新生標的薬剤を中心に. 第 39 回制癌剤適応研究会. 2006 年 3 月 3 日 (福岡)

H. 知的財産権の出願登録状況

1. 特許取得
なし

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

EstrogenがER α 依存性ヒト乳がん細胞のBCRP、P-gpのタンパク発現レベルを低下させることが示された。この反応はestrogenの活性に依存的であり、またER α の活性に依存的であった。本研究により、がん細胞における薬物排出トランスポーターの発現を低下させてがん細胞を抗がん剤に感受性にするという今までにない新しい癌化学療法の戦略を構築する可能性が示された。

A. 研究目的

本研究では、抗がん剤耐性に関与するABC輸送体P-糖タンパクとBCRPに焦点を当て、これらABC輸送体の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

Estrogen receptor α (ER α) を発現してestrogen依存性に増殖するヒト乳がん細胞MCF-7、T-47Dに、レトロウイルスを用いてMyc-BCRP遺伝子導入、MDR1遺伝子導入を行い、それぞれMCF-7/BCRP、MCF-7/MDR、T-47D/BCRP、T-47D/MDRを作成した。また、ER α を発現しないヒト乳がん細胞MDA-MB-231に同様に遺伝子導入を行い、MDA-MB-231/BCRP、MDA-MB-231/MDRを樹立した。これらの細胞を種々の濃度のestradiolを加えたestrogen-free medium (phenol red-free DMEMに7%の透析・活性炭処理FBSを添加した培地)で培養し、培養液中のestrogenが細胞のBCRP発現、P-gp発現に与える影響を調べた。細胞のBCRP発現、P-gp発現はWestern blotおよびFACSで調べた。このうち、細胞の内因性のBCRP発現の定量には抗BCRP抗体を用い、外因性のMyc-tagged BCRPの発現の定量には抗Myc抗体を用いた。

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

BCRP (Breast Cancer Resistance Protein、ABCG2) は抗がん剤イリノテカン (CPT-11) を細胞外に排出するポンプとして働き、イリノテカン耐性を担う細胞膜タンパクである。我々はこれまでに種々のestrogen、抗estrogen、flavonoid、gefitinib (イレッサ) などがBCRPに直接結合してBCRPの薬物排出活性を阻害することを報告してきた。今回我々はestrogenがBCRPタンパクの発現低下を引き起こすことを見出した。

Estrogen receptor α (ER α) を発現してestrogen依存性に増殖するヒト乳がん細胞MCF-7の培養液に30 pM-3 nMのestradiolを添加したところ、MCF-7細胞の内在性のBCRPの発現が約10分の1に低下した。ER α を発現していないヒト肺がん細胞A549のBCRP発現はestradiolに影響されなかった。

Estrogenは、MCF-7細胞にHaMycBCRPレトロウイルスを導入して作成したMCF-7/BCRP細胞の外來性のMyc-tagged BCRPの発現も抑制した。このBCRP発現低下はestrogenの活性依存的であり、estrone、diethylstilbestrolは同様の発現抑制効果を示したが、tamoxifenはこの反応に拮抗的に働いた。またこのBCRP発現低下はER α 依存的であり、ER α のsiRNAにより発現低下がキャンセルされた。EstrogenはBCRP mRNAの発現レベルには影響しなかった。

EstrogenがMCF-7/MDRのP-gpの発現を低下させることを見出した。EstrogenによるP-gpの発現抑制もBCRPの発現抑制と同様の機序でおこると考えられた。

D. 考察

本研究により、estrogenがBCRP、P-gpのタンパク発現レベルを低下させることが示された。estrogenは核内のER α と結合して種々の遺伝子の発現調節を行っている。今回、estrone、diethylstilbestrolがestradiolと同様の発現抑制効果を示したこと、tamoxifenが拮抗的に働いたこと、ER α のsiRNAにより発現低下がキャンセルされたことより、この反応はestrogen-ER α 系による何らかの遺伝子の発現調節を介していると考えられる。この反応の下流に位置するABC輸送体発現調節因子の同定が今後の課題である。

E. 結論

本研究により、estrogenがER α 依存性ヒト乳がん細胞のBCRP、P-gpのタンパク発現レベルを低下させることが示された。この反応はestrogenの活性に依存的であり、またER α の活性に依存的であった。本研究により、がん細胞における薬物排出トランスポーターの発現を低下させてがん細胞を抗がん剤に感受性にするという今までにない新しい癌化学療法の戦略を構築する可能性が示された。

F. 研究発表

- 1 Imai Y, Ishikawa E, Asada S, and Sugimoto Y. Estrogen-mediated Post-transcriptional down-regulation of Breast Cancer Resistance Protein/ABCG2. *Cancer Res.* 2005; 65: 596-604.
- 2 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*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005; 15: 1051-1054.
- 3 Mashima T, Oh-hara T, Sato S, Mochizuki M, Sugimoto Y, Yamazaki K, Hamada J, Tada M, Moriuchi T, Ishikawa Y, Kato Y, Tomoda H, Yamori T, and Tsuruo T. P53-defective tumors with a functional apoptosome-mediated pathway: a new therapeutic target. *J. Natl. Cancer Inst.* 2005; 97: 765-777.
- 4 Sugimoto Y, Tsukahara S, Ishikawa E, and Mitsuhashi J. Breast Cancer Resistance

Protein (BCRP): a Molecular Target for Anticancer Drug Resistance and Pharmacokinetics/Pharmacodynamics. *Cancer Sci.* 2005; 96: 457-465.

- 5 Kage K, Fujita T, and Sugimoto Y. Role of Cys-603 in dimer/oligomer formation of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Cancer Sci.* 2005; 96: 866-872.
- 6 Yanase K, and Sugimoto Y. Functional SNPs of BCRP in drug effect and inhibitor development. *Cancer Lett.* 2006; 234: 73-80.
- 7 Imai Y, Tsukahara S, Mitsuhashi J, and Sugimoto Y. Functional Single Nucleotide Polymorphisms of the ABC-transporter ABCG2/BCRP Gene. *Trends in Cancer Res.*, in press.
- 8 Takahashi S, Ito Y, Hatake K, and Sugimoto Y. Gene therapy for breast cancer. *Breast Cancer*, in press.
- 9 Mutoh K, Mitsuhashi J, Kimura Y, Tsukahara S, Ishikawa E, Sai K, Ozawa S, Sawada J, Ueda K, Katayama K, and Sugimoto Y. A T3587G Germline Mutation of the MDRI Gene Encodes a Non-functional P-glycoprotein. *Mol. Cancer Ther.*, in press.

G. 知的財産等の出願・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

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

本研究は、PTEN/AKT/PI3K シグナル経路を利用した薬物治療に関する研究、および DNA 修復と消化器癌の薬物治療に関する研究の二つに分けられる。ともに抗癌剤の感受性を規定する因子として注目されている。前者については、消化器癌や乳癌における PTEN の異常や AKT の発現の変化を観察することで、新しい分子標的治療の基礎的データを得た。後者は、癌における DNA 修復能を正確に評価することで、これまでの報告と異なった、DNA 修復能と抗癌剤の感受性との関係を知ることができた。

A. 研究目的

癌抑制遺伝子の一つとして最近知られるようになった PTEN は前立腺癌、子宮内膜癌、神経膠芽腫、消化器癌など、様々な癌で発現の異常が観察される。また、胚細胞での変異は Cowden 病や Bannayan-Zonana 症候群を生じ、甲状腺がんや乳癌の頻度が著しく上昇することが知られている。PTEN は AKT/PI3K 系のリン酸化経路のフォスファターゼである。つまり、癌における PTEN の異常は AKT や TOR などの PI3K 系シグナルの持続的活性化につながる。AKT の調節機構はさまざまな固形癌や血液腫瘍で異常を認めているため、AKT は新しい分子標的として注目されている。欧米では既にこの AKT や TOR 阻害剤を用いた Phase I, II の臨床試験が開始されている。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することを第一の目的とする。また薬剤の効果予測として、mTOR や AKT 阻害剤の新しい分子標的としての意義を検討する。

B. 研究方法

1) PTEN/AKT/PI3K シグナル経路を利用した薬物治療に関する研究

特定の癌において、この PTEN の異常と AKT の活性化が従来の抗癌剤やホルモン感受性に関係していることを具体的に明らかにするため、PTEN についてはまず、プロモーターのメチル化および

LOH の検索を行なった。次に臨床検体を用いて、AKT のリン酸化を免疫組織化学染色で確認し、抗癌剤感受性との関係を検討した。

2) DNA 修復と消化器癌の薬物治療に関する研究
独自の方法である多重蛍光式のマイクロサテライト不安定性解析を約 2000 例の臨床検体でこない、DNA ミスマッチ修復異常とされていた患者の集団を Type A と Type B の二つの亜集団に分類した。この二つの集団がこれまで考えられていたように薬剤の感受性に差があるのかを詳細に検討している。

C. 研究結果

1) PTEN/AKT/PI3K シグナル経路を利用した薬物治療に関する研究

胃癌、乳癌では、PTEN が LOH の症例で AKT がリン酸化されている症例が有意に多かった。pAKT 陽性の症例で 5-FU や CDDP に対して有意に抗癌剤耐性であり、PTEN の LOH を示す症例は予後が不良であった。

乳癌では pAKT 陽性の症例でホルモン感受性が高い傾向があった。

2) DNA 修復と消化器癌の薬物治療に関する研究
我々が以前より提唱している方法により、多くの消化器癌における DNA ミスマッチ修復の異常を正確に評価したところ、これまでの報告と異なりミスマッチ修復異常のある腫瘍において、p53 の遺

伝子異常が多いことが判明した。

D. 考察

1) PTEN/AKT/PI3K シグナル経路を利用した薬物治療に関する研究

PI3K/AKT 経路によるアポトーシス抑制シグナルは、これまでも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。また、癌における AKT の持続的活性化には、PTEN の機能異常が関係していることが予想されていた。我々の検討は特定の癌において、この PTEN の異常と AKT の活性化が従来の抗癌剤やホルモン感受性に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。今後は、より臨床的に化学療法との関係をさらに詳細に検討をしていく。

2) DNA 修復と消化器癌の薬物治療に関する研究

DNA ミスマッチ修復異常がある癌は、比較的予後がよいが、抗癌剤治療には耐性であることが報告されてきた。ところが、我々の研究の成果から、DNA ミスマッチ修復異常とされていた患者の集団が Type A と Type B の二つの亜集団に分類されることが明らかとなり、状況がより複雑になった。Type A は本来の DNA ミスマッチ修復異常から癌化した集団と考えられるが、Type B については、DNA ミスマッチ修復異常以外の分子異常も発癌に関わっている可能性が高い。今後はこの二つの集団がこれまで考えられていたように薬剤の感受性に差があるのかを詳細に検討していく。

E. 結論

AKT/PI3K シグナル経路は胃癌における抗癌剤の感受性や乳癌におけるホルモン治療感受性を規定する重要な因子であることが明らかとなった。これを利用した分子標的治療や感受性試験の開発にむけて研究を継続する予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tokunaga E, Kataoka A, Kimura Y, Oki E, Mashino K, Nishida K, Koga T, Morita M, Kakeji Y, Baba H, Ohno S, and Maehara Y. The association between Akt activation and

resistance to hormone therapy in metastatic breast cancer. *Eur J Cancer*. 2006 in press

2. Tanoue K, Yasunaga T, Kobayashi E, Miyamoto S, Sakuma I, Dohi T, Konishi K, Yamaguchi S, Kinjo N, Takenaka K, Maehara Y, and Hashizume. Laparoscopic cholecystectomy using a newly developed laparoscope manipulator for 10 patients with cholelithiasis. *Surg Endosc*. 2005 Dec in press
3. Oda S, Zhao Y, and Maehara Y. Microsatellite instability in gastrointestinal tract cancers: a brief update. *Surg Today*. 2005;35(12):1005-15.
4. Tsujita E, Taketomi A, Gion T, Kuroda Y, Endo K, Watanabe A, Nakashima H, Aishima S, Kohnoe S, and Maehara Y. Suppressed MKP-1 is an independent predictor of outcome in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology*. 2005;69(4):342-7.
5. Tanaka S, Shimada M, Shirabe K, Maehara S, Tsujita E, Taketomi A, and Maehara Y. Surgical outcome of patients with hepatocellular carcinoma originating in the caudate lobe. *Am J Surg*. 2005 ;190:451-5.
6. Oki E, Tokunaga E, Nakamura T, Ueda N, Futatsugi M, Mashino K, Yamamoto M, Watanabe M, Ikebe M, Kakeji Y, Baba H, and Maehara Y. Genetic mutual relationship between PTEN and p53 in gastric cancer. *Cancer Lett*. 2005 8;227:33-8.
7. Tokunaga E, Kimura Y, Oki E, Ueda N, Futatsugi M, Mashino K, Yamamoto M, Ikebe M, Kakeji Y, Baba H, and Maehara Y. Akt is frequently activated in HER2/neu-positive breast cancers and associated with poor prognosis among hormone-treated patients. *Int J Cancer*. 2006 15;118:284-9.
8. Tanaka Y, Miyamoto S, Suzuki SO, Oki E, Yagi H, Sonoda K, Yamazaki A, Mizushima H, Maehara Y, Mekada E, and Nakano H. Clinical significance of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor