

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第1分野

課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 ……	124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 ……	129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 ……	134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 ……	142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 ……	148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 ……	152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 ……	156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 ……	160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 ……	167
 第3分野			
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 ……	175
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 ……	185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤 由起子 ……	194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 ……	200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 ……	210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 ……	218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 ……	226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 ……	235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 ……	243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 ……	252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 ……	257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ ……	261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	網脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法の確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ー ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（平 成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・ 細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合 研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成 17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる 新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサ ーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬 効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤 の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺 伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的 評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性・安全性に関する研究

ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発

所属 国立がんセンター研究所薬効試験部
研究者 西尾 和人

研究要旨 非臨床試験において、フッ化ピリミジンとその代謝活性体に対する新規標的分子をLC-MSにより同定した。また、その生物学的機能の確認、および臨床検体を用いた検証を開始した。臨床試験における症例登録では予定症例数を超え、症例集積は順調に進行している。臨床検体による遺伝子発現解析では胃癌の治療標的となりうる新規遺伝子を見出し、その生物学的機能についての研究を進めている。

分担研究者

- (1) 長浜バイオ大学バイオサイエンス学部 水上民夫
- (2) (株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所先端技術研究部 関島勝
- (3) 国立がんセンター中央病院第一領域外来部 山田康秀
- (4) 熊本大学大学院医学薬学研究部 大川原正
- (5) 住友ベークライト(株)神戸基礎研究所 福西賢晃

A. 研究目的

非臨床、臨床試験において、ケミカルゲノミクスの手法を用いてTS-1、5-FU等の主要抗癌剤の新規薬効貢献因子の探索、同定を行う。また、抗癌剤固定化アフィニティクロマトグラフィーに有用な非特異的吸着の低減を目指した新規固定化担体の開発を行う。また臨床試験において、集積された臨床検体の遺伝子発現解析を実施し、(1)胃癌の5FU感受性因子、(2)胃癌の治療標的遺伝子の探索、同定を行い治療標的へ応用することを目的とする。さらに、見出された標的分子に対するライブラリー化合物を用いたスクリーニングを実施し、同定された因子に対して優れた抗癌活性を有する新規化合物を見出すことを目的とする。

B. 研究方法

(1) 化合物ライブラリーおよび5-FU誘導体の合成
5FU、d5FU、d5FUMP誘導体は4-phthaliminobutyl bromideでリンカーを導入し固定化可能な誘導体化合物の合成を行った。また、ライブラリー化合物の誘導体化を行いライブラリーの拡充を行った。

(2) 抗癌剤固定化アフィニティクロマトグラフィーによる結合蛋白質の分離と同定

【5-FU関連化合物誘導体の固定化】

固定化用担体としてAffiGel-10 (BioRad)を用いた。各種化合物には、ビーズ担体への固定化のためのブチル

アミンを導入している。固定化した化合物は、Uracilおよび5-Fluoro uracil (5-FU) (ピリミジン環1位および3位)、deoxyuridine (dUrd) および5-Fluoro deoxyuridine (5-FdUrd) (ピリミジン環3位)、deoxyuridine monophosphate (dUMP) および5-Fluoro deoxyuridine monophosphate (5-FdUMP) (ピリミジン環3位、およびリン酸基)の10種である(カッコ内は固定化用ブチルアミン鎖の導入位置)。上記の化合物60mM/DMSO溶液中で、AffiGelを24h攪拌することにより固定化反応を行った。

【アフィニティクロマトグラフィーによる結合タンパク質の分離】

アフィニティクロマトグラフィーには、5-FUの主要適応癌種である大腸癌由来の細胞株であるDLD-1から、Hepes-buffered saline (HBS)中で超音波破碎によって抽出したタンパク質を用いた。化合物固定化ビーズ約50μlとDLD-1抽出タンパク質50μgをHBS1ml中で攪拌しながら4℃、1hの結合反応を行った。HBSによる洗浄(1ml×3)ののち、2×SDS sample bufferによって結合タンパク質を溶出した。溶出タンパク質はSDS-PAGEに供し、銀染色によって可視化し、LC-MSにより結合タンパク質の同定を行った。

(3) 新規固定化担体の開発

【固定化担体の作製】

エタノール中に、Poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate / p-nitrophenyloxycarbonyl ethylene glycol methacrylate / 3-mercaptopropyl dimethylethoxysilane = 7/3/0.3を加え、ラジカル重合によりポリマー(1)を得た。(1)のシクロヘキサノン溶液にシリカゲル粒子(粒径:40~75μm、細孔:450nm)を加え超音波処理し、ろ過乾燥後、加熱処理して(1)でコートされたシリカゲル粒子(2)を得た。

【新規固定化担体の性能評価】

① BSAを用いたmicro-BCA法によるタンパク非特異吸

着性評価

(2)の p-nitrophenyl ester 基を monoethanol amine で不活化処理したものを BSA 水溶液（濃度：45mg/mL）中で処理した。その後、緩衝液で洗浄し、SDS 水溶液で非特異吸着した BSA を溶出させ micro-BCA 法にて定量した。

② 細胞抽出液を用いた SDS-PAGE 法によるタンパク非特異吸着性評価

上記と同様に(2)の不活化処理したものを細胞抽出液(DLD-1)中で処理した。その後、緩衝液で洗浄し、結合タンパクを SDS-PAGE で分離し、結合タンパクを銀染色で可視化した。

③ タモキシフェン-エストロゲンレセプター系を利用したターゲットタンパク吊り上げ評価

DMSO 中で(2)に NH₂ 基有するタモキシフェン(Tam)3 当量を加え攪拌し(2)にタモキシフェンを固定化した。タモキシフェン(Tam)を固定化した(2)を細胞抽出液(MCF-7)中で処理した。その後、緩衝液で洗浄し、結合タンパクを SDS-PAGE で分離し、結合タンパクを銀染色で可視化した。また、ターゲットタンパクであるエストロゲンレセプターをウェスタンブロットにより検出した。

(4) 遺伝子発現解析による 5FU 感受性因子の同定

対象は 5FU を用いた化学療法への適応となる進行胃癌症例。1)化学療法治療前、2)治療開始 1 週間後、3)治療終了時の 3 点において、臨床検体を採取する。アフィメトリクス社製全遺伝子網羅型マイクロアレイ(U133, plus2.0, 56,000 遺伝子)を用いて遺伝子発現解析を行ない、多数の臨床像との関連を統計学的手法を用いて明らかにする。また、副次的な解析として、治療前の胃癌部・胃非癌部内視鏡サンプルの比較から癌細胞で著明に発現亢進ないし低下している遺伝子を特定し、胃癌の治療標的となりうる遺伝子の同定と治療への応用を行なう。

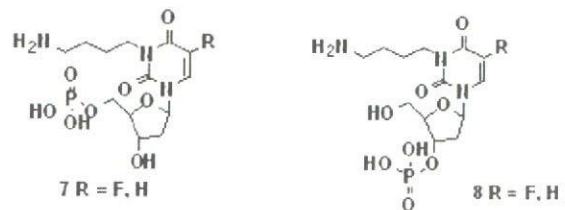
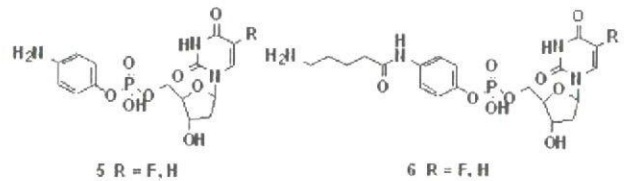
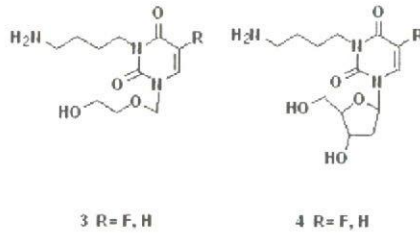
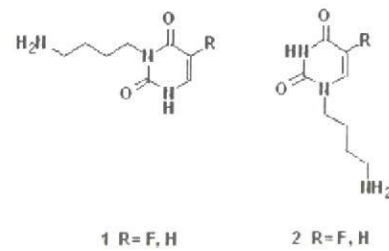
(倫理面への配慮)

in vitro での研究は、臨床検体を対象としていない。本研究における遺伝子発現解析はゲノムを対象とせずゲノム解析の範疇に属さない。しかし、本研究は当該施設の IRB およびヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理的方針に準拠して実施した。さらに、同研究過程のすべての実験データは保存し、必要な場合、公表することとした。

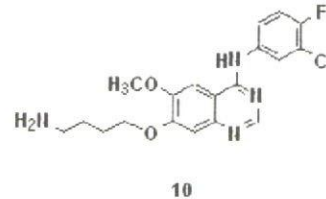
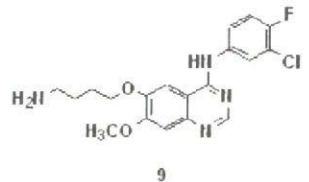
C. 研究結果

(1) 化合物ライブラリーおよび 5-FU 誘導体の合成リンカーを導入した抗がん剤(1-10)を合成した。

【5FU 誘導体関係】



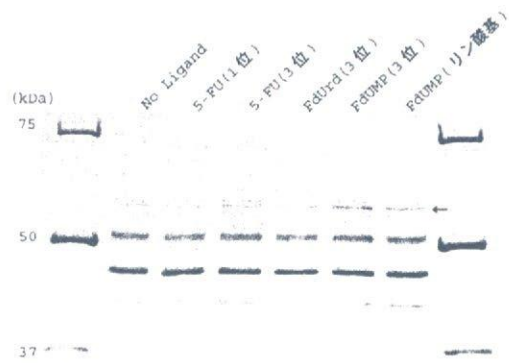
【Gefitinib 誘導体関係】



(2) 抗癌剤固定化アフィニティクロマトグラフィーによる結合蛋白質の分離と同定

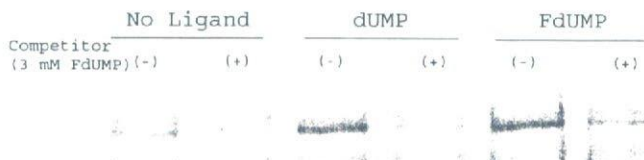
各種化合物固定化ビーズから溶出したタンパク質の電気泳動像を図 1 に示した。60kDa 付近のバンド(矢印)は、dUMP、FdUMP(ピリミジン環 3 位、およびリン酸基を介して固定化)固定化ビーズで特に強く検出された。

バンド強度は、dUMP, FdUMP 固定化ビーズによって多少異なるが、ビーズに固定化された化合物量を全て定量していないため、吊上げ量の違いから、タンパク質と化合物の親和性について論じることはできない (ゲルと化合物の固定化量については5-FU(ピリミジン環3位を介して固定化)について、固定化ゲルのFの定量により、ゲルの官能基の20%前後に化合物が固定化できていることを確認している)。



【図1】各種5-FU関連化合物固定化ビーズによるアフィニティクロマトグラフィーによる精製タンパク質の電気泳動像。dUMP, FdUMP固定化ビーズに強く検出されたバンドを矢印で示した。

さらに、このタンパク質が、固定化 dUMP, FdUMP に結合していることを確認するため、結合反応液に 3 mM FdUMP を添加し、その結合阻害効果を検討した。その結果、dUMP, FdUMP 固定化ビーズのどちらにおいても、バンド強度が有意に減少した (図 2)。

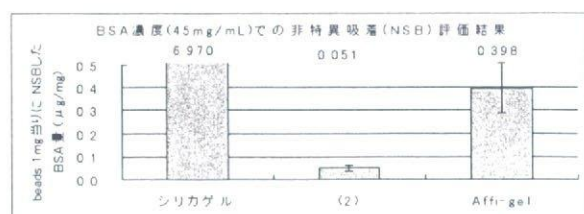


【図2】dUMP, FdUMP固定化ビーズに結合するタンパク質の遊離FdUMPによる結合競合阻害実験。3mM FdUMPにより、固定化ビーズへの結合が阻害されている。

(3) 新規固定化担体の開発

【BSAを用いたmicro-BCA法によるタンパク非特異吸着性評価】

シリカゲルに対し PEG 系ポリマーをコートすることでタンパク非特異吸着の抑制が確認できた。また、Affi-Gel 10 (Bio-Rad) に比べて BSA の非特異吸着が低減した。



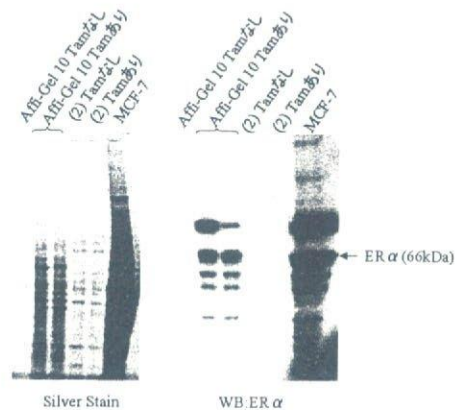
【細胞抽出液を用いた SDS-PAGE 法によるタンパク非特異吸着性評価】

細胞抽出液(DLD-1)を用いた場合はBSAを用いた場合とは逆に、タンパクの非特異吸着量が Affi-Gel 10 (Bio-Rad) に比べて多くなる結果となった。



【タモキシフェン-エストロゲンレセプター系を利用したターゲットタンパク吊り上げ評価】

Affi-Gel 10 (Bio-Rad) ではターゲットタンパクであるエストロゲンレセプターをタモキシフェン(Tam)が吊り上げているが、(2)を用いると吊り上げていないことが分かった。



(4) 遺伝子発現解析による 5FU 感受性因子の同定

【RNA の抽出および品質管理】

各臨床検体の品質管理は標準化された各工程を経て実施された。採取された臨床検体の胃癌組織は、Isogen (ニッポンジーン)でホモジナイズしRNAを抽出した。また、PBMCの血液からの分離はFicoll-Hypaqueを用いてリンパ球・単核球を回収し、生検検体と同様にRNAを抽出した。RNAの収量は遺伝子発現解析を行う十分な量が得られた。一方、品質については、分光光度計による260nm/280nmの比、バイオアナライザーによる18S/28Sの比、全RNA中の28SrRNAの百分率及び新しいRNA品質指標のRNA Integrity Number (RIN)を計測した結果、遺伝子発現解析の実施に十分な質を有していた。

【マイクロアレイの測定】

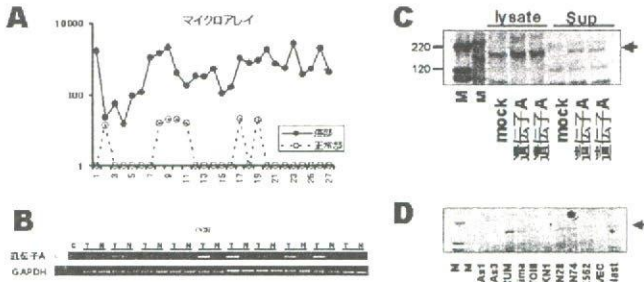
治療前後のリンパ球サンプルと、胃癌部・胃非癌部内視鏡サンプルの計4サンプルを1症例につき測定する。

RNA の品質 (28S/18S 比等)、RNA 増幅異常がないこと、同一症例 4 サンプル内で脱落サンプルがないことを条件にマイクロアレイの測定を行い、2006 年 3 月 20 日現在、43 症例 x 4、計 172 サンプルの測定が終了した。

【胃癌の 5FU 感受性因子】臨床情報 (5FU 治療の臨床効果、有害事象、生存期間、病理組織等) について取りまとめを行なっている。測定は終了したので、臨床情報がまとまり次第、解析を行なう。平成 18 年 5 月頃から解析が可能と考えられる。

【胃癌の治療標的遺伝子の同定】

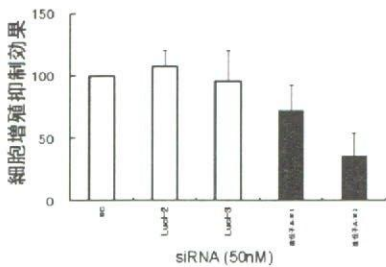
二次目的である癌関連遺伝子の同定は臨床検体 60 サンプルに対して行なわれた。正常部と癌部で発現の変化を paired-t 検定で解析し、胃癌部で有意に ($p < 0.0001$) 発現が亢進している遺伝子を約 200 同定した。これらの中には、発癌において新規の 5 遺伝子、胃癌において新規の 25 遺伝子を含んでいた。そのうち「遺伝子 A」は、遺伝子情報がほとんどなく、機能も明らかになっていない新規の遺伝子である。胃癌部全例において著明な発現亢進が明らかになり、PCR においても臨床検体癌部で再現性が確認された (図 1)。



【図 1】 新規癌遺伝子 A: マイクロアレイの発現値。全例癌部において強度の発現亢進が認められる。B: PCR での再現性。C: 新規抗体の作成と強制発現株。D: 新規抗体による癌細胞株での蛋白発現。

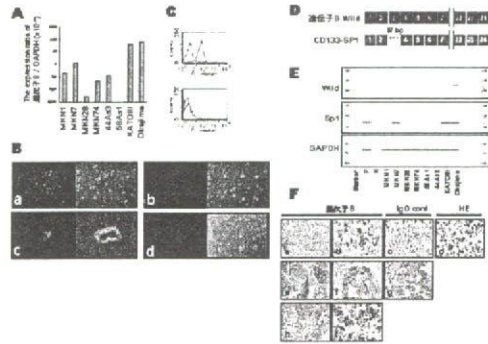
また、この遺伝子については正常組織で発現がない特徴から新しい腫瘍マーカーとして有望と考え、蛋白 C 末端付近を認識する抗体を作成した (図 1)。「遺伝子 A」を腫瘍マーカーとして臨床応用するためには、血清に対し ELISA で本蛋白を検出することが必要なため、上記抗体以外に他の 3 抗原蛋白を作製した。続く抗体を作成中である。

次に「遺伝子 A」が治療標的となり得るかを siRNA による細胞増殖抑制効果を見ることで検討した。本遺伝子の mRNA 発現抑制は、胃癌細胞株の細胞増殖を著明に阻害した (図 2)。この結果は、創薬の標的として可能性があり、機能を含めて解析を続けている。



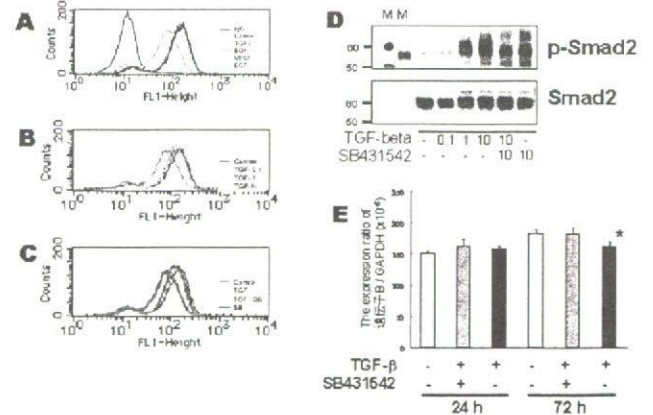
【図 2】 新規癌遺伝子に対する siRNA による細胞増殖抑制効果 mRNA レベルの遺伝子発現抑制は、胃癌細胞株の細胞増殖を著明に阻害する。

また、マイクロアレイによる発現解析は、興味のある遺伝子の発現状況が即座に同時的に把握できる特徴がある。他癌種で幹細胞マーカーと考えられている「遺伝子 B」の発現を確認したところ、胃癌臨床検体でも発現亢進が確認でき、胃癌細胞株を用いて検討を行った。「遺伝子 B」は初めて胃癌細胞株および臨床検体で発現が確認されたこと、その転写産物は胃癌では exon skip を伴う variant form が優位であることが示された (図 3)。



【図 3】 幹細胞マーカー「遺伝子 B」の胃癌細胞における発現。A: 胃癌細胞株の転写産物 B: 細胞膜への局在 C: Flowcytometry による発現 D, E: 胃癌細胞株の転写産物は、variant form が優位である。F: 臨床検体での免疫組織染色

また、未分化な細胞にのみ厳しく発現が制御されている幹細胞マーカー「遺伝子 B」は分化するに従い発現が消失する事が知られており、これらを制御する分子の探索を行なった。数種の胃癌に関連するリガンド刺激により、TGF-beta のみ「遺伝子 B」の膜局在を減少させることが明らかになった。この減少効果は、TGF-beta 受容体阻害薬によってキャンセルされることを確認した (図 4)。



【図 4】 幹細胞マーカー「遺伝子 B」の膜局在は TGF-beta によって制御される。A: 各種リガンド刺激と膜局在 B: 濃度依存性効果 C: TGF-beta 受容体阻害剤による効果消失 D: TGF-beta シグナル刺激反応の確認 E: 転写レベルでの発現抑制効果

D. 考察

(1) 化合物ライブラリーおよび5-FU誘導体の合成
他の分担研究班の途中経過報告ではアミノ官能基をカルボキシル基、メルカプト基への置換、リンカーの長さを検討することにより樹脂への固定化収率を上げることができると考えられた。固定化用の誘導体合成はおおむね順調に進んでおり、今後、スクリーニングに用いる化合物ライブラリーのさらなる拡充が期待される。

(2) 抗癌剤固定化アフィニティクロマトグラフィーによる結合蛋白質の分離と同定
5-FU関連化合物を固定化したAffiGel-10を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより、5-FdUMPおよびdUMP固定化ビーズに結合する約60kDaのタンパク質を同定した。このタンパク質は、遊離の3 mM FdUMPによって固定化ビーズへの結合が阻害されたことから、dUMP, FdUMP結合性タンパク質であることが強く示唆された。FdUMPは、プロドラッグである5-FUの活性化型代謝産物であり、その主たる標的分子としてThymidylate synthase (TS)が既に知られている。今回同定されたタンパク質は、約36kDaのTSとは分子量も異なり、また、抗TS抗体とも交差しなかったことから、新規なdUMP, FdUMP結合タンパク質であると考えられる。現在、質量分析による本タンパク質の同定に着手しており、タンパク質が同定できれば、速やかに5-FUの薬効規定との関連を培養細胞系における本分子の強発現・発現抑制実験により確認するとともに、その化合物への結合のメカニズムについても検討を加えたい。

(3) 新規固定化担体の開発

タンパク無吸着性に優れたPEGを主成分とするポリマーをシリカゲル粒子にコートしたことからタンパク非特異吸着が抑制されたと考えられる。しかし、BSAの非特異吸着量はAffi-Gel 10 (Bio-Rad) に対して少ないものの、細胞抽出液に含まれるタンパクでは逆に多くなるなどタンパクの種類により異なることが示唆された。本新規固定化担体は、汎用性があり既存の製品に比して取り扱いが容易であることから、リガンド長の改良などによりその性能は大きく改善すると期待される。

(4) 遺伝子発現解析による5FU感受性因子の同定

【マイクロアレイの測定】

43症例×4、計172サンプルの測定が終了し、解析に最低限必要な数の測定は終了しつつある。

【胃癌の5FU感受性因子】

本研究では、予定症例を超えて登録を行っており、質の高い解析が可能となると考えられる。臨床情報の収集待ちの状態になり、2ヵ月後から解析可能と考える。

【胃癌の治療標的遺伝子の同定】

新規の遺伝子である「遺伝子A」については、慢性胃

炎を背景とした胃粘膜でもほとんど発現がない特徴から、胃癌「発生」の段階に関連する遺伝子ではないと考える。実際に細胞株では他癌種においても著明な発現亢進が見られ、また mRNA 発現抑制が細胞増殖抑制効果をもつことから癌細胞特異的で細胞増殖に関連した機能をもつことが予測される。臨床検体の中でも発現にかなりばらつきがあり、胃癌組織像、悪性度、5FU感受性などの臨床情報との相関はほとんど報告されておらず、近年精力的に研究されている「癌幹細胞」の見地から極めて意義が高いと考えられる。またこの幹細胞マーカーは、初めてTGF- β シグナル制御下にあることを示した(投稿準備中)。幹細胞マーカー「遺伝子B」については、マイクロアレイによる発現解析により胃癌で発現が見られることが明らかになった。今後の検討が期待される。

E. 結論

5-FUに対する新規薬効貢献分子の探索を目的とし、5-FU関連化合物のアフィニティクロマトグラフィーによる蛋白質吊り上げ実験および吊り上げ蛋白質の同定が可能となった。現在、5-FUの新規標的因子と想定される蛋白質の同定を検討中であり、生物学的機能の解析、化合物スクリーニング系の構築に取り掛かっている。現在、同アフィニティクロマトグラフィーを用いた臨床検体によるヒトサンプルでの検討を準備している。

また、臨床試験において本研究の症例登録は予定症例数を超えることができ、順調に進行している。臨床検体のマイクロアレイ測定は大部分が終了し、現在臨床情報のとりまとめを行なっている。副次的なエンドポイントである胃癌の治療標的遺伝子の同定テーマでは、癌細胞特異的で細胞増殖に関連した機能をもつ新規遺伝子Aを特定し、その機能、腫瘍マーカーとしての可能性、治療標的の可能性につき研究を進めている。また、既知の幹細胞マーカー「遺伝子B」が胃癌でも発現が見られTGF- β シグナル制御下にあることを初めて明らかとするなど、治療応用への研究も進んでいる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakai R, Ishida H, Asai A, Ogawa H, Yamamoto Y, Kawasaki K, Akinaga S, Mizukami T, and Yamashita Y. Novel telomerase inhibitors identified by a forward chemical genetics approach using a yeast strain with shortened telomere length. Chem. Biol. (in press).
2. Yamada Y, Ohtsu A, Boku N, Miyata Y, Shimada Y, Doi T, Muro K, Muto M, Hamaguchi T, Mera K, Yano T, Tanigawara Y, and Shirao K. Phase I/II study of oxaliplatin with weekly bolus fluorouracil and high-dose leucovorin as first-line therapy for patients with colorectal cancer. Jpn. J.

- Clin. Oncol. (in press).
3. Goto A, Yamada Y, Shirao K, Shimada Y, Muro K, Hamaguchi T, Yasui H, and Kato K. Phase II study of combination therapy with S-1 and irinotecan in patients with advanced colorectal cancer. Ann. Oncol. (in press).
 4. Sakuma N, Komatsubara Y, Takeda H, Hirose H, Sekijima M, Nojima T, and Miyakoshi J. DNA strand breaks are not induced in human cells exposed to 2.1425 GHz band CW and W-CDMA modulated radiofrequency fields allocated to mobile radio base stations. Bioelectromagnetics. 27: 51-57, 2006.
 5. Nishio K, Arao T, Shimoyama T, Fujiwara Y, Tamura T, and Saijo N. Translational studies for target-based drugs. Cancer Chemother Pharmacol. 56: s90-s93, 2005.
 6. Korfee S, Eberhardt W, Fujiwara Y, and Nishio K. The role of DNA-microarray in translational cancer research. Curr. Pharmacogenomics 3: 201-216, 2005.
 7. Shimizu T, Yamada Y, Yasui H, Shirao K, and Fukuoka M. Clinical application of immunoreactivity of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) in gastric scirrhus carcinoma treated with S-1, a new DPD inhibitory fluoropyrimidine. Anticancer Res. 25: 2997-3002, 2005.
2. 学会発表
1. Nishio, K. EGFR Targeting in Various Malignancies. The 21st Bristol-Myers Squibb Nagoya International Cancer Treatment Symposium & Meet the Expert. 2006. 2. 24-25. Nagoya.
 2. Nishio K. Molecular Factors Which Influence the Sensitivity to EGFR-TKI. 2nd ISC International Conference on Cancer Therapeutics. 2005. 11. 10-12. Istanbul Turkey.
 3. Nishio K, Saijo N. Lung Cancer: From Bench to Clinic. 24th International Congress of Chemotherapy. 2005. 6. 4-6. Manila Philippines.
 4. Shimizu T, Yamamoto N, Fujiwara Y, Yamada Y, Sakamoto T, Takayama K, Hirose M, Tamura T, Tokudome T, Klimovsky J. Phase I study of BMS-247550 (ixabepilone) given every 3 weeks in Japanese patients with refractory solid tumors. Proc ASCO 23: 2050, 2005.
 5. Yasui H, Shirao K, Yamamoto N, Shimada Y, Yamada Y, Muro K, Hamaguchi T, Boku N, Yoshino T, Saijo N. A phase I study of the chimeric monoclonal anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody cetuximab as a single agent in subjects from Japan with advanced solid tumors: Safety, pharmacokinetics (PK). Proc ASCO 23: 3209, 2005.
 6. Muro K, Najima M, Hamaguchi T, Yamada Y, Shimada Y, Shirao K, Ito Y, Imai A, Kagami K, Tachimori Y. Definitive chemoradiotherapy followed by salvage therapy for locoregional failure might be standard a treatment option for stages I-III esophageal squamous cell carcinoma. Proc ASCO 23: 4069, 2005.
 7. Yamada Y, Goto A, Ura T, Yasui H, Kato K, Hamaguchi T, Muro K, Shimada Y, Shimoda T, Shirao K. Prognostic and predictive significance of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R), epidermal growth factor receptor (EGFR), and HER2 in metastatic colorectal cancer. Proc ASCO 23: 9649, 2005.
 8. Sakai K, Hosoi M, Sekijima M, Arao T, Nishimura T, Akimoto S, Okawara T, Mizukami T, Kato H, Nishio K. Proteomics Approach to Identify the Cellular Targets of Small Molecules 第一回臨床プロテオーム研究会 (東京)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社