

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書（Ⅱ）

## 目 次

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 ……	589
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 ……	636
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 ……	656
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 ……	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 ……	680
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 ……	691
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 ……	707
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 ……	720
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 ……	728
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 ……	740
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 ……	761
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 ……	772
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 ……	783
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 ……	795
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 ……	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 ……	826
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 ……	836
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 ……	839
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 ……	919
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 ……	939
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 ……	951
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 ……	966

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 …… 979
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 …… 1000
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 …… 1021
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 …… 1042
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 …… 1054
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 …… 1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 …… 1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾 恵治 …… 1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈 邦夫 …… 1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 …… 1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 …… 1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 …… 1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤 雄一 …… 1115

## 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 近畿大学医学部ゲノム生物学教室

研究者 西尾 和人

### 研究要旨

ケミカルゲノミクス手法で5-FU等の新規薬効貢献因子の同定を行った。抗癌剤固定化担体の開発を行った。LC-MS/MS解析により5-FUの新規薬効関連蛋白質を同定した。臨床試験において臨床検体の遺伝子発現、蛋白質解析を実施し、胃癌の治療効果因子、予後規定因子、標的分子の探索、検証を行った。

### 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
- (6)(株)メディカルプロテオスコープ 秋元信吾

### 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)内視鏡生検胃癌組織における抗癌剤感受性規定遺伝子の解析による化学療法の効果予測

化学療法の適応となる進行胃癌症例を対象とする。治療は5-fluorouracil系薬剤(5FU, TS-1)を中心とし、一部塩酸イリノテカンを受ける症例を含む。JCOG消化器癌グループ臨床試験ベースの症例。登録前に

提供者の文書による同意を得る。内視鏡生検サンプルは治療開始前と治療後の2時点において、胃癌原発巣と正常胃粘膜組織からそれぞれ1検体ずつ採取し、リンパ球検体は化学療法施行前に末梢血を10ml、治療開始8日後10mlそれぞれ1検体ずつ採取した。[検体管理]内視鏡検体はRNA保存液中に攪拌し-80度で保存し、リンパ球検体は末梢血から抽出し、-80度で冷凍保存した。個人識別情報は匿名化され厳重に管理した。臨床検体は厳重な匿名化後、三菱安全科学研究所に送付されRNA抽出、マイクロアレイ測定が行なわれた。RNAのquality checkでは、9割前後のサンプルが問題なく測定可能であった。遺伝子発現解析はAffymetrix社製Human Genome U133 Plus 2.0 Arrayを用いた。

症例は胃癌28例のtraining setで遺伝子の選択ならびに予測モデルを構築し、独立サンプルである13例のvalidation setで予測の検証を行った。

解析ソフトは、BRB Array Tools software, ver. 3.3.0

(<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>)を使用した。解析方法は、t-testを用いて、2群間で差があり(P<0.005)、かつ2倍以上の差を認める遺伝子を特定した。次に下記の6種類の分類器(1)Compound Covariate Predictor (2)Diagonal Linear Discriminant Analysis (3)1-Nearest Neighbor (4)3-Nearest Neighbors (5)Nearest Centroid (6)Support Vector Machinesを用いて、training setを対象にモデルの構築を行った。最後に独立したサンプルであるvalidation set 13例に対し構築した予測モデルでの予測を行った。

(2)内視鏡生検胃癌組織における抗癌剤感受性規定遺伝子の解析による新規治療標的候補遺伝子の同定30症例・計60検体に対し、RNAの抽出を行い、Affymetrix社のプロトコールに従って測定した。マ

マイクロアレイは、Affymetrix 社製の全遺伝子型 GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array を使用した。統計解析は BRB software を用いた。median 値による正規化後、同一患者内の癌部と非癌部サンプルに対して、Paired T-test を行った。癌部で有意差 ( $p < 0.00005$ ) を示し、かつ 5 倍以上発現が亢進している遺伝子を同定した。

細胞増殖の検討では、scramble-siRNA、Luciferase 遺伝子に対する siRNA の 3 種類を control-siRNA とし、KIAA1199 に対する 2 種類の siRNA を用いて KIAA1199 の mRNA 発現抑制を行った。細胞増殖抑制効果の検出は、MTT アッセイにより行った。

### (3) 患者血清サンプルのプロテオーム (LC-MS/MS) 解析による標的、薬効関連分子の同定

ポリアクリルアミドゲル中での Cys 残基の還元アルキル化、トリプシンによる加水分解、および生成ペプチドの抽出と濃縮からなる一連の実施手順は、揮発性溶媒を用いた。

ペプチド混合物の質量分析は、微流速の逆相液体クロマトグラフィーとイオントラップ型タンデム質量分析を組み合わせた方法を用いた。

取得した質量スペクトルと蛋白質配列データベースとの照合は、Mascot® ソフトウェア (Mascot ver. 2.1) による標準的な方法を適用した。具体的には、切り取ったゲル片 (バンドあるいはスポット): 対照バンド/スポットも同時に処理、色素抜き: アセトニトリルと水の 1:1 溶液 1 mL 中にて 4°C 一晩静置、還元アルキル化、加水分解、ペプチド抽出・濃縮 (Shevchenko 法)、質量スペクトルの取得 (LC-MS/MS)、データベースとの照合 (Mascot)

蛋白質の同定の手順で実施した。

### (4) 各種抗癌剤の誘導体合成および化合物ライブラリーの拡充

タモキシフェン誘導体 (1) は既知の方法で 4' OH 基に保護基を導入後、4 位の OH 基をアルキル化し、シリカゲルカラムで分離精製した。

FdUMP 誘導体 (2), dUMP (3), dUTP (4), FdUDP (5), FdUTP (6), FUMP (7), FUDP (8), FUTP (9) は常法に従い、保護し、リンカーを導入し、リン酸化試薬を導入し、シリカゲルカラムで分離精製し、最後に脱保護し、凍結乾燥し単離した。化合物 3-9 は固定化 FdUMP 誘導体より吊り上げた Pyruvate Kinase の機能を解析するために合成した。

### (5) 質量分析による結合タンパク質の同定

レジンに固定化した上述の化合物を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製したタンパク質を、2 次元電気泳動 (2-DE) によって分離した。CBB 染色の後、結合タンパク質のスポットをゲルから切り出して、トリプシン消化を行った。消化後のペプチド混合溶液を LC-MS/MS (MAGIC 2002 LC instrument; Michrom BioResources) によって分析し、得られた MS/MS データをもとに、Mascot software (version 2.1.0, an MS/MS Ion Search mode, Matrix Science) を用いてタンパク質の同定を行った。

### (6) FdUMP, dUMP と PKM2 の酵素化学的解析

前年度までにアフィニティークロマトグラフィーによるタンパク質精製実験に用いていたヒト結腸癌由来細胞株である DLD-1 より全 RNA を抽出し、RT-PCR 法によって PKM2 の cDNA をクローニングした。

クローニングした cDNA は、シーケンスを確認後、大腸菌用の発現プラスミドを構築し、BL21 (DE3) 株に導入後、発現誘導を行った。発現した組換え PKM2 は、既報の組換えピルビン酸キナーゼの精製法に従い、硫酸アンモニウム分画、ゲルろ過クロマトグラフィー、およびイオン交換クロマトグラフィーによって精製した。

精製した組換え PKM2 を用いた In vitro 酵素アッセイ系によって、PKM2 の酵素活性に対する FdUMP, dUMP をはじめとした各種ヌクレオチドの影響を解析した。酵素アッセイ系には、ピルビン酸キナーゼと乳酸脱水素酵素の反応を組み合わせ、NADH に由来するアッセイ溶液の 340nm の吸光度変化を検出することによってピルビン酸キナーゼの酵素活性を測定する NADH-LDH coupled method (METHODS IN ENZYMOLOGY, 90:153-(1982)) を用いた。

### (7) 低分子固定化の検討およびその最適化

前年度開発した固定化担体を以下の 2 点に着目し、改良を実施した。①リガンド固定化量②リガンドのスペーサー長とポリエチレングリコール鎖長との関係: まず、ポリマーをシリカビーズにコーティングする際のポリマー溶液濃度について 0.3wt% を 50wt% に変更し固定化担体改良品 (1) を得た。次に Poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate / p-nitro phenyloxy carbonyl ethylene glycol methacrylate / 3-mercaptopropyl dimethyl ethoxy silane の組成比について従来の 7/3/0.3 を 97/3/0.3 とし固定化担体改良品 (2) を調製した。さらに、poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate を methoxy ethyl acrylate に変えて固定化担体改良品 (3) を作製した。最後に、p-nitro phenyloxy carbonyl ethylene glycol methacrylate のスペーサー長を 2 倍とし固定化担体改良品 (4) を得た。固定化担体の性能評価は以下のように実施した。DMSO 中で (1)~(4) に NH<sub>2</sub> 基を有するタモキシフェン (Tam) を 3 当量加え攪拌し固定化した。さらに、Tam を固定化した (1)~(4) 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 (ER $\alpha$ ) をウェスタンブロットにより検出した。

### (倫理面への配慮)

本研究は、遺伝子の発現量を探索的、半定量的に解析するものである。本研究は遺伝子発現に関する研究であり、「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い、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する。個人の識別につ

ながる情報は、個人識別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。もし遺伝子発現解析内容が外部に漏洩することがあっても、提供者およびその家族に対する社会的差別や精神的苦痛などの不利益行為につながる可能性は極めて低い。本臨床試験付随研究の骨子「胃癌における抗癌剤感受性規定遺伝子の検討」については、国立がんセンター倫理委員会により2004年7月24日に承認されており、全例で文書による同意を得ている。

### C. 研究結果

#### (1) 内視鏡生検胃癌組織における抗癌剤感受性規定遺伝子の解析による化学療法の効果予測

##### a) 胃癌部生検による化学療法奏効(CR+PR)の予測

6種類の分類器を training set で検証したところ各方法で71%~79%の判別率であった。次に13例の独立サンプルへの予測を行ったところ85%(11/13)の効果予測が可能であった。

##### b) 胃癌部生検による化学療法無効(PD)の予測

6種類の分類器を training set で検証したところ各方法で約50%の判別率であった。独立サンプルに対して、69%(9例/13例)の効果予測率であった。胃癌部生検による化学療法無効の予測については、奏効例モデルに比べ低かった。

##### c) 治療前末梢血単核球による化学療法無効の予測

6種類の分類器を training set で検証したところ各方法で約39~57%の判別率であった。独立サンプルに対して77%(10/13)の薬剤効果予測が可能であった。単核球検体も有用である可能性を示した。

各予測モデルの結果をまとめてみると、3種類の予測モデルで、予測ミスはほとんどかぶっていないことが示唆された。このことは複合して予想すれば、実用化の可能性が高いことを示唆している。

内視鏡サンプルあるいは末梢血リンパ球サンプルを用いて、胃癌の化学療法の効果を予測する研究は、国内外においてほとんどなく、また臨床応用しやすいことから、本研究結果は非常に重要な意味を持つと考えられた。

#### (2) 内視鏡生検胃癌組織における抗癌剤感受性規定遺伝子の解析による新規治療標的候補遺伝子の同定

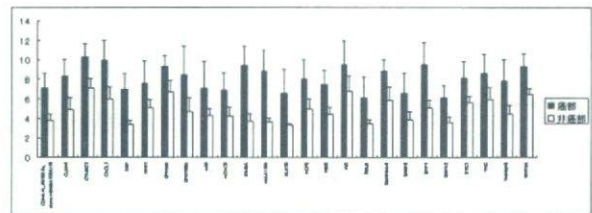
胃癌部に特異的に発現する遺伝子の同定のため、30症例を対象に正常部と癌部で発現の変化を paired-t 検定で解析し、癌部で有意差( $p < 0.00005$ )を示し、かつ5倍以上発現が亢進している遺伝子を149同定した。これらの149遺伝子のうち、特に新規性が強く有望と思われる25遺伝子を表1に示す。

表1で示した25遺伝子のマイクロアレイの正規化後シグナル値を、癌部と非癌部に分けて、グラフで平均値とSD値を示した。シグナル値は $\log_2$ 変換している。そのマイクロアレイの発現値を図1に示す。いずれの遺伝子も非癌部に比べて5倍~20倍高く胃癌部に発現していた。

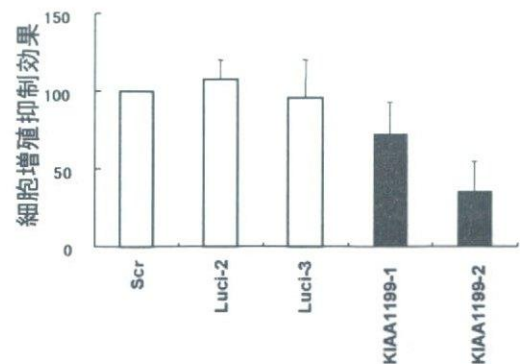
さらに25遺伝子中、KIAA1199に関しては scramble-siRNA、Luciferase 遺伝子に対する siRNA の3種類を control-siRNA とし、KIAA1199 に対する2種類の siRNA を用いて KIAA1199 の mRNA 発現抑制を行った。細胞増殖抑制効果の検出は、MTT アッセイにより行った。胃癌細胞株に対し、KIAA1199 の mRNA 発現抑制は、著明な細胞増殖抑制効果を示し、治療標的分子としても有望であることが確認された(図2)。

Probe set (D Name)	Gb acc	Symbol
226997_at	CDNA FLJ10196 fis, clone HEMBA1004776	W74476 ESTs
222549_at	claudin 1	AF101051 CLDN1
225681_at	collagen triple helix repeat containing 1	AA584310 CTRHC1
204470_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma grow	NM_00151 CXCL1
209955_s_at	fibroblast activation protein, alpha	U76833 FAP
205119_s_at	formyl peptide receptor 1 /// formyl peptide recep	NM_00202 FPR1
201141_at	glycoprotein (transmembrane) nmb	NM_00251 GPNMB
205220_at	G protein-coupled receptor 109B /// G protein-c	NM_00601 GPR109B
224646_x_at	H19, imprinted maternally expressed untranslated r	BF569051 H19
206858_s_at	homeo box C6	NM_00450 HOXC6
227140_at	Inhbin, beta A (activin A, activin AB alpha polypep	A1343467 INHBA
212942_s_at	KIAA1199	AB033025 KIAA1199
209792_s_at	kallikrein 10	BC002710 KLK10
209949_at	neutrophil cytosolic factor 2 (65kDa, chronic granu	BC001606 NCF2
204114_at	nidogen 2 (osteonidogen)	NM_00736 NID2
41469_at	peptidase inhibitor 3, skin-derived (SKALP)	L10343 PI3
206211_at	selectin E (endothelial adhesion molecule 1)	NM_00045 SELE
207714_s_at	serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock prot	NM_00435 SERPINH1
223122_s_at	secreted frizzled-related protein 2	AF311912 SFRP2
209875_s_at	secreted phosphoprotein 1 (osteoopontin, bone sial	M83248 SPP1
205499_at	sushi-repeat-containing protein, X-linked 2	NM_01446 SRPX2
204595_s_at	stanniocalcin 1	A1300520 STC1
201645_at	tenascin C (hexabrachion)	NM_00216 TNC
206025_s_at	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	AW188198 TNFAIP6
213425_at	wingless-type MMTV integration site family, memb	A1968085 WNT5A

[表1] 胃癌で特に新規性が強く有望と思われる25遺伝子



[図1] 胃癌で特に新規性が強く有望と思われる25遺伝子のマイクロアレイ発現値



[図2] KIAA1199の発現と細胞増殖抑制効果  
scramble-siRNA、Luciferase 遺伝子に対する siRNA の3種類(グラフ黒)を control-siRNA とし、KIAA1199 に対する2種類の siRNA (グラフ白)を用いて KIAA1199 の mRNA 発現抑制を行った。細胞増殖抑制効果の検出は、MTT アッセイにより行った。

胃癌細胞株に対し、KIAA1199のmRNA発現抑制は、著明な細胞増殖抑制効果を示した。KIAA1199は治療標的分子としても有望であることが確認された。この内容は新規の重要な分子を多く含むと考え、「胃癌高発現遺伝子特定による胃癌診断および創薬への利用、特願2006-306057」として特許の出願を行った。

(3) 患者血清サンプルのプロテオーム(LC-MS/MS)解析による標的、薬効関連分子の同定  
分析・解析に供したバンド(図3)/スポット(図4)に印をつけた。

図3 SDS-ゲル  
(CBB G250にて染色)

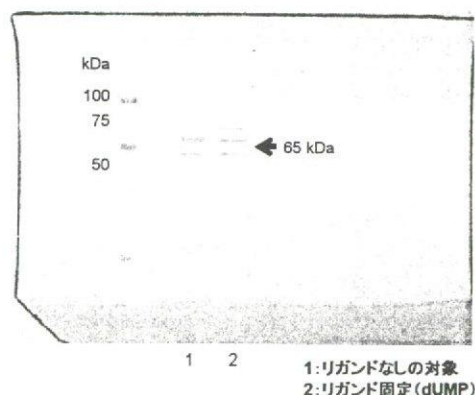
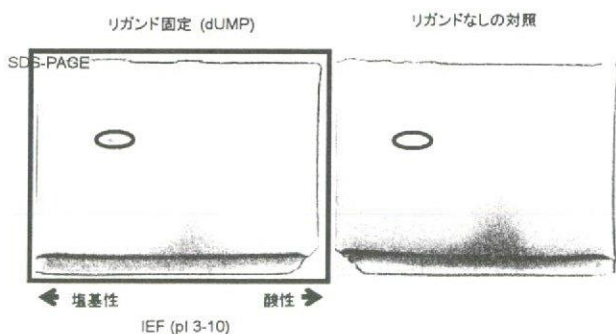


図4 二次元ゲル  
(各2枚ずつ供与)

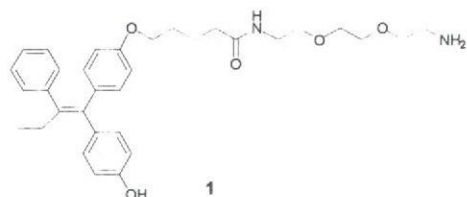


各バンド/スポットのペプチド解析から各スポットの蛋白質を同定した。

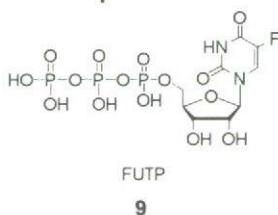
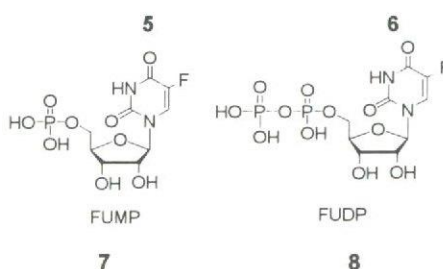
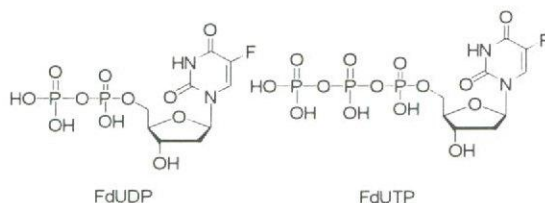
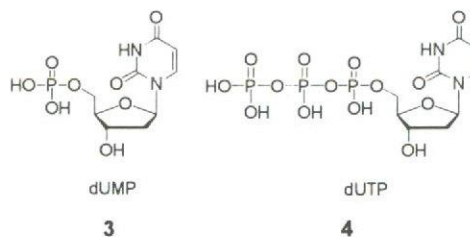
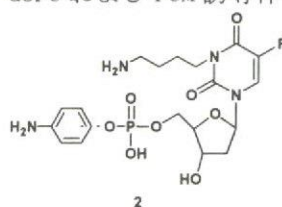
(4) 各種抗癌剤の誘導体合成および化合物ライブラリーの拡充

タモキシフェンにポリエーテルリンカーを結合した固定化合物のアフィニティカラムを製法した(図5)

図5 固定化合物の合成



d5FUおよびFUM誘導体を合成した。



(5) 質量分析による結合タンパク質の同定

アフィニティークロマトグラフィーによる精製タンパク質の2-DEによる分析の結果、FdUMP、dUMPどちらにも、同一のタンパク質が結合していることが確認できた。また、dUMPによるクロマトグラフィーが、より多くの結合タンパク質を結合・精製できたことから、dUMPに結合したタンパク質をLC-MS/MS分析に供した。LC-MS/MSデータを用いたデータベース検索によって、結合タンパク質がpyruvate kinase M2 (PKM2)であることを高い精度で同定することができた。ピルビン酸キナーゼには、4種のサブタイプ(M1, M2, L, R)があり、それぞれ組織特異的に発現している。PKM2は、胎児の細胞や未分化の増殖細胞



の他、種々の癌細胞で発現していることが明らかになっている。さらに、癌細胞では他の細胞と異なり、通常の4量体の活性型ではなく、活性の低い2量体が高発現しており、このことが癌細胞において、核酸合成の活性化等の癌細胞特異的な代謝への変換を担う要因の一つと考えられている。さらに一部の癌において、高発現した2量体PKM2は、臨床で実際にマーカーとして利用されている。このように、FdUMPおよびdUMPの結合タンパク質が、癌細胞の代謝のKey分子であることが明らかになったため、さらにPKM2とFdUMP, dUMPの関係を詳細に解析することとした。

#### (6) FdUMP, dUMPとPKM2の酵素化学的解析

DLD-1細胞からクローニングしたPKM2のcDNAを用いて、大腸菌用のPKM2発現プラスミドを構築し、大腸菌に導入後、発現誘導を行うことで、大腸菌によって組換えPKM2タンパク質を作製した。さらに、既報に従い精製を行った結果、高純度の組換えPKM2を精製することができた。

精製したPKM2の酵素を用いたIn vitro酵素アッセイ系により、FdUMP, dUMPの他、各種ヌクレオチド、ヌクレオシド、塩基をアッセイ系に添加し、その酵素活性に対する影響を調べた。その結果、各種化合物の中でも、dUMPがPKM2の活性を最も強く阻害し、またその阻害活性は、dUMPの生理的濃度でも認められた。さらに、dUMPおよびPKM2をアロステリックに活性化するフルクトース1,6ビスリン酸(FBP)を、PKM2に作用させる順序の違いによって、dUMPのPKM2阻害活性が変化することが明らかとなった。これらのことから、dUMPは新規なPKM2の阻害物質であること、またその阻害効果は、FBPによるPKM2の活性化機構に関連性があることが示唆された。

#### (7) 低分子固定化の検討およびその最適化

固定化改良品(2)、(3)についてはTamの有無にかかわらずターゲットタンパクが吊り上がった。固定化改良品(1)、(4)についてはターゲットタンパクの吊り上げ量が少なかった。そこで、固定化改良品(1)、(4)についてはアブライ量を増やし、(2)については同条件で再評価した。(1)においてターゲットタンパクの吊り上げが認められた(図6)。

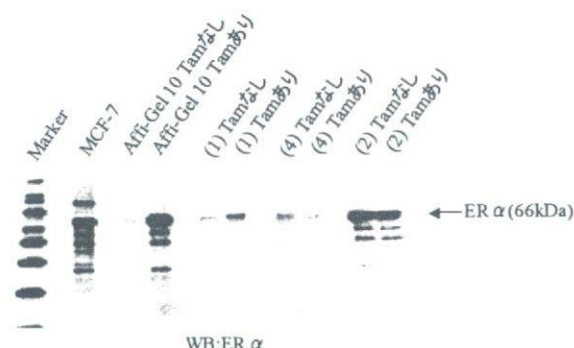
図6 固定化改良品を用いた、タモキシフェン結合蛋白質の吊り上げ。改良品(1)において標的蛋白質の吊り上げの向上がみられた。結合蛋白質であるエストロゲンレセプター(ER $\alpha$ )をウエスタブロットングで検出した。

#### D. 考察

内視鏡生検胃癌組織における抗癌剤感受性規定遺伝子の解析を目的とした本研究は、予定通りの症例の登録並びにマイクロアレイの測定が完了した。検体の保存管理もトラブルなく行われている。化学療法の効果を予測するモデルの構築においては、臨床応用可能である内視鏡検体あるいは末梢血リンパ球検体を用いて化学療法の効果を予測する遺伝子特定し、予測モデルを構築した。予定症例内で結果を独立症例で検証し、70%台の予測正答率であることを示した。内視鏡サンプルを用いて胃癌化学療法前に、生存期間を予測する研究は国内外においてほとんど行われておらず、この結果は、極めて価値の高いものと考えている。

全遺伝子網羅型マイクロアレイを用いて、胃癌に高発現する遺伝子を定量化、特定した。各癌種に対しては、このような遺伝子発現情報をもとにした治療標的遺伝子、マーカー遺伝子の選択は試みられている。しかしながら、胃癌に対して全遺伝子網羅型マイクロアレイを用いて、同一症例の癌部と非癌部を比較するデザインでの研究はほとんどない。胃癌に高発現する遺伝子と同定する事は、腫瘍の細胞生物学的な理解に重要であるばかりでなく、新規抗癌剤、ワクチン、抗体など治療薬開発への応用の他に、腫瘍マーカーとしての診断応用などさまざまな応用が考えられる。一部の遺伝子に対しては、機能解析を進めており生物学的な機能として癌細胞の細胞増殖に関わることを示し、治療標的分子の可能性を提示した。現在本研究の解析は末梢血単核球と臨床情報、化学療法の効果予測、新規治療標的候補遺伝子の機能解析などについて行われている。

5-FUの抗腫瘍効果は、主としてDNA前駆体の合成阻害に基づくと考えられており、腫瘍細胞内に取り込まれたフルオロウラシルはウラシルと同じ経路でF-deoxy UMPに転換され、deoxy UMPと拮抗してチミジル酸合成酵素を抑制しDNA合成を阻害する。また、フルオロウラシルはウラシルと同様にRNAにも組み込まれF-RNAを生成し、同時にリボソームRNAの形成を阻害すると考えられている。本研究により、5-FUの主たる抗腫瘍効果として考えられているDNA合成阻害に働く重要分子であるdeoxy UMPに特異的に結合する分子として同定されたピルビン酸キナーゼM1/M2は、解糖系の重要な酵素である。哺乳動物ではL型、R型、M1型、M2型と呼ばれる4種類のアイソザイムが存在する。これらのアイソザイムは、酵素学的諸性質はもちろんのこと、発現の制御機構も異なっている。成体ではL型は肝臓、腎臓、小腸、膵 $\beta$ 細胞で、R型は赤血球で、M1型は骨格筋、心筋、



脳で特異的に発現しているが、M2型は多くの組織に存在する。胎児期の初期においてはどの組織もM2型のみが発現しているが、組織の分化・発達が進むにつれて上記の組織特異的アイソザイムに置き換わってゆく。細胞が癌化すると、逆に組織特異的アイソザイムは減少あるいは消失して、M2型が出現あるいは増加する。また、炭水化物の多い食事（高炭水化物食）は過剰なグルコースを脂肪に変えて貯蔵するための代謝系（解糖系や脂肪酸合成系）を活性化するが、ピルビン酸キナーゼの遺伝子発現も肝臓（L型）や脂肪組織（M2型）において亢進する。

ピルビン酸キナーゼが関連する疾患としては、ピルビン酸キナーゼ欠損症がよく知られている。ピルビン酸キナーゼ欠損症は、Emden Meyerhof系酵素の欠損による貧血の代表例として知られており、ピルビン酸キナーゼ欠損は特に米国、イタリア、フランスで比較的多く見られ、常染色体劣性遺伝の遺伝形式をとる。臨床的には本疾患は幼時期に重い急性溶血（或いは新生児黄疸）として一般に発症する。もっと遅くに発症する型は、予後がより良い。ビリルビン結石、頭蓋異常が見られることが稀でない。検査上、貧血の程度は様々であるが、正球性、一部大球性で、核のある球状赤血球を認める。10%以上の網状赤血球が常にある。ピルビン酸キナーゼの活性は正常値の10-40%となる。酵素活性は両親とも同じように低下している。in vitroで自発的に強く溶血する。これはATPで復元するが、グルコースでは正常化しない。脾への取り込みは特に増加していないので、脾摘は非論理的ではあるが、一般症状が改善することがある。以上のようなピルビン酸キナーゼの正常の機能、ピルビン酸キナーゼ欠損による既知の疾患から、5-FUによる重大な副作用のうち、貧血、肝機能障害、黄疸との関連が示唆される。5-FUの拮抗的作用により遊離したdeoxy UMPが結合するピルビン酸キナーゼが増加することによって、ピルビン酸キナーゼ欠損症と同様な症状が出るという仮説が成り立つ。今後、この仮説の検証はもちろんのこと、新規標的・薬効を考える上で解糖系の関連が重要であると考えられる。

本研究でFdUMP、dUMPの新規結合タンパク質として同定されたPKM2は、種々の癌細胞において、通常の高活性型4量体より活性の低い2量体を高発現することで、活発に核酸合成を行う癌細胞特有の代謝様式への変換を制御していると考えられている。一方、本研究対象である5-FUは、核酸合成阻害によって抗癌活性を示す抗癌剤であり、その核酸合成阻害は5-FUの活性型代謝物であるFdUMPがチミジル酸生成酵素（Thymidylate synthase; TS）の活性を阻害することによって起こる。また、その過程で、代謝拮抗の対象であるdUMPの細胞内濃度が一時的に上昇することが知られている。今年度の研究によって、PKM2はdUMPによってその酵素活性が阻害されることが明らかとなった。以上のことから、5-FUによる核酸代謝阻害の作用機序において、FdUMPによるTS

阻害の結果蓄積したdUMPによって、癌細胞の核酸合成活性化の重要な因子であるPKM2の活性阻害が起こるといふ新規の薬理機構の存在が示唆された。

固定化技術については非特異吸着によりターゲットタンパクが吊り上がったと考えられる。わずかではあるがターゲットタンパクの吊り上げが認められた(1)はシリカビーズにポリマーをコーティングする際、ポリマー濃度を上げた系であり、リガンドを固定化できる官能基量が他の系に比べ高くなっている。そのため、ターゲットタンパクの吊り上げ能が向上したと考えられる。また、本固定化担体はAffi Gel 10(Bio-Rad)よりも取り扱いやすく、正確な秤量も可能である。現時点ではAffi Gel 10(Bio-Rad)よりもターゲットタンパクの吊り上げ量は少ないが、リガンドの固定化量をさらに上げることでAffi Gel 10(Bio-Rad)と同等以上の性能が期待できる。

## E. 結論

(1) 胃癌の5FU感受性因子並びに有害事象規定因子を予測するモデルを構築した。現在までに胃癌の化学療法の効果予測する遺伝子モデル、胃癌の予後予測遺伝子、胃癌治療標的分子を同定し、検証を行った。治療標的に関しては、特許出願し治療応用への研究の段階に入った。

(2) 血清のプロテオーム解析により、5FUの新たな標的、薬効関連分子として、ピルビン酸キナーゼM1/M2を同定した。

(3) タモキシフェン誘導体、5FU誘導体、Gefitinibを薬効貢献分子として選び、これらにリンカー鎖を結合、これをリガンドとして固定化した。

(4) ケミカルゲノミクスによる分子探索の基盤技術の開発として担体のリガンド固定化量を増大させることにより、これまで吊り上げることができなかったターゲットタンパクの吊り上げに成功した。本固定化技術は利便性に優れタンパク非特異吸着も少なく、さらなるターゲットタンパク吊り上げ能の向上も期待できる。

(5) FdUMP、dUMPの新規結合タンパク質として癌細胞の核酸合成のKey分子であるPKM2を同定し、dUMPのPKM2阻害活性を明らかにした。5-FUのTS阻害時に蓄積するdUMPがPKM2を阻害するという、未知薬理機構の可能性を示した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Takeda M, Arao T, Yokote H, Komatsu T, Yanagihara K, Sasaki H, Yamada Y, Tamura T, Fukuoka K, Kimura H, Saijo N, Nishio K. AZD2171 shows potent antitumor activity against gastric cancer over-expressing FGFR2/KGFR. Clin Cancer Res. (in press)

Sekine I, Nishio K, Tamura T, Saijo N. A literature review of genes regulating the

sensitivity of solid tumor cell lines to cytotoxic agents. *Jpn J Clin Oncol.* (in press)

Nishio K, Arao T. Progress in the field of molecular biology and application of biotechnology to medical oncology. *Acta Med Kinki Univ.* 31(2): 57-62, 2006.

Nishio K, Arao T, Kato T, Yokote H. EGFR mutation in various tissues. *Cancer Chemother Pharmacol.* 58(17): s39-s41, 2006.

Yanagihara K, Takigahira M, Takeshita F, Komatsu T, Nishio K, Hasegawa F, Ochiya T. A photon counting technique for quantitatively evaluating progression of peritoneal tumor dissemination. *Cancer Res.* 66(15): 7532-7539, 2006.

Sekine I, Minna JD, Nishio K, Tamura T, Saijo N. A literature review of molecular markers predictive of clinical response to cytotoxic chemotherapy in patients with lung cancer. *Int. Thoracic Oncol.* 1: 31-37, 2006.

Arao T, Yanagihara K, Takigahira M, Takeda M, Koizumi F, Shiratori Y, Nishio K. ZD6474 inhibits tumor growth and intraperitoneal dissemination in a highly metastatic orthotopic gastric cancer model. *Int. J. Cancer.* 118: 483-489, 2006.

Nakai R, Ishida H, Asai A, Ogawa H, Yamamoto Y, Kawasaki K, Akinaga S, Mizukami T, Yamashita Y. Novel telomerase inhibitors identified by a forward chemical genetics approach using a yeast strain with shortend telomere length. *Chem. Biol.* 13: 183-190, 2006.

## 2. 学会発表

Matsumoto K, Arao T, Tanaka K, Maegawa M, Fujita Y, Kawaishi M, Fukui T, Kato T, Fukai J, Sakai K, Koizumi F, Yokote H, Yamada Y, Saijo N, Nishio K. CD133/prominin-1 is expressed in gastric cancer. The Joint Meeting of The 3<sup>rd</sup> ISC International Conference on Cancer Therapeutics and The 11<sup>th</sup> International Symposium on Cancer Chemotherapy. 2006. 12. 6-8. Tokyo.

Arao T, Takeda M, Tanaka K, Matsumoto K, Maegawa M, Fujita Y, Kawaishi M, Fukui T, Kato T, Fukai J, Sakai K, Koizumi F, Yokote H, Saijo N, Nishio K. AZD2171 shows potent anti-tumor activity against gastric cancer expressing variant K-SAM/FGFR2. The Joint Meeting of The 3<sup>rd</sup> ISC International Conference on Cancer Therapeutics

and The 11<sup>th</sup> International Symposium on Cancer Chemotherapy. 2006. 12. 6-8. Tokyo.

Sekine I, Nishio K, Saijo N, Tamura T. A literature review of genes regulating the sensitivity of solid tumor cell lines to cytotoxic agents. The Joint Meeting of The 3<sup>rd</sup> ISC International Conference on Cancer Therapeutics and The 11<sup>th</sup> International Symposium on Cancer Chemotherapy. 2006. 12. 6-8. Tokyo.

Takeda M, Arao T, Yokote H, Sakai K, Yanagihara K, Kimura H, Sasaki H, Tamura T, Saijo N, Nishio K. AZD2171 shows potent anti-tumor activity against gastric cancer expressing variant K-SAM/FGFR2. American Association for Cancer Research 97<sup>th</sup> Annual Meeting. 2006. 4. 1-5. Washington DC USA.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

【発明の名称】胃癌高発現遺伝子特定による胃癌診断および創薬への利用

【出願番号】特願 2006-306057

【出願日】平成18年11月10日

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

---

平成18年度  
政策創薬総合研究  
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19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