

固形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 近畿大学医学部内科学腫瘍内科学部門 助教授

研究要旨

日本人非小細胞肺癌患者より独自に樹立した細胞株を含め、EGFR変異を有する6つの非小細胞肺癌細胞株を用いendogenouslyに発現している変異型EGFRの活性化状態及びEGFRシグナルを詳細に検討した。exon19のdeletionとexon21のpoint mutationではEGFRの活性化状態が異なることが示唆された。

A. 研究目的

EGFRの遺伝子変異の種類によりEGFR-TKIsの臨床効果が異なる可能性が示唆されている。そこで、EGFR遺伝子変異の異なる細胞株におけるEGFRシグナルの活性化状態を調べることにより、臨床的効果の相違が生じる可能性について検索した。

B. 研究方法

日本人非小細胞肺癌患者より独自に樹立した細胞株を含め、EGFR変異を有する6つの非小細胞肺癌細胞株を用いendogenouslyに発現している変異型EGFRの活性化状態及びEGFRシグナルを詳細に検討した。さらに、これら変異型EGFRの恒常的活性化のメカニズムを探索すべく、EGFR及び主要なリガンドであるEGF、TGF- $\alpha$ に対する中和抗体を用いて変異EGFRをもつ細胞株がautocrineにより自身のEGFRを活性化しているかどうか、またクロスリンカーを用いた実験にて変異EGFRはリガンド非依存的にダイマーを形成し得るかどうかを検索した。

C. 研究結果

exon19のdeletionをもつPC-9、MA-1細胞においてはEGFRの1068番目のチロシン残基の恒常的なリン酸化が認められるのに対し、exon21のpoint mutationをもつKT-2、KT-4細胞においては1068番目に加え845番目、1173番目のチロシン残基にも恒常的なリン酸化が認められ、変異型によってEGFRの活性化状態が異なることが示唆された。さらにこのEGFR活性化状態の違いが下流シグナルの及ぼす影響を検討したところ、1173番目チロシン残基からのシグナルとして知られるShcのリン酸化状態がexon21のpoint mutationをもつ細胞株において亢進していることが見出された。さらに我々は、これら変異型EGFRの恒常的活性化のメカニズムを探索すべく、EGFR及び主要なリガンドであるEGF、TGF- $\alpha$ に対する中和抗体を用いて変異EGFRをもつ細胞株がautocrineにより自身のEGFRを活性化しているのではないこと、さらにクロスリンカーを用いた実験にて変異EGFRはリガンド非依存的にダイマーを形成し得るこ

とを見出した。

D. 考察

ヒト上皮成長因子受容体(Epidermal Growth Factor Receptor: EGFR)のチロシンキナーゼドメインにおける遺伝子変異(exon19 deletion, exon21のpoint mutation)とEGFRチロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)に対する奏効との間の強い相関関係が明らかとなった。さらにexon19の変異とexon21の変異では、EGFR-TKIで治療された場合の予後が異なるという報告もなされ(Clinical Cancer Research vol12; p839-844, p3908-3914 2006)、EGFR遺伝子変異の生物学的意義の解明に加え、これらの遺伝子変異のタイプの違いにより何が異なってくるかの検討も、今後のEGFR-TKIの最適使用に不可欠な事項である。これらの遺伝子変異のタイプによって引き起こされるEGFR活性化及び下流シグナルが異なっているという今回の我々の研究成果はEGFR遺伝子変異の生物学的意義に寄与するものと考えられる。

E. 結論

EGFR遺伝子変異の種類によりEGFR-TKIsの臨床効果が異なる可能性が示唆された。

F. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. Yamamoto N, Tsurutani J, Yoshimura N, Asai G, Moriyama A, Nakagawa K, Kudoh S, Takada M, Minato Y, and Fukuoka M. Phase II study of weekly paclitaxel for Relapsed and refractory small cell lung cancer. Anticancer Res 2006; 26: 777-81.
2. Okamoto I, Araki J, Suto R, Shimada M, Nakagawa K, and Fukuoka M. EGFR mutation in gefitinib-responsive small-cell lung cancer. Ann Oncol 2006; 17: 1028-29.

3. Nakagawa K. Clinical development of EGFR-tyrosine kinase inhibitors in Japan. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 58: 33-37.
4. Nakagawa K, Kudoh S, Matsui K, Negoro S, Yamamoto N, Latz J E, Adachi S, and Fukuoka M. A phase I study of pemetrexed (LY231514) supplemented with folate and vitamin B12 in Japanese patients with solid tumours. *Br J Cancer* 2006; 95: 677-82.
5. Asai G, Yamamoto N, Kurata T, Tamura K, Uejima H, Nakagawa K, and Fukuoka M. Phase I and Pharmacokinetic Study of Combination Chemotherapy Using Irinotecan and Paclitaxel in Patients with Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 2006; 1: 226-30.
6. Kaneda H, Kurata T, Tamura K, Uejima H, Nakagawa K, and Fukuoka M. A Phase I Study of Irinotecan in Combination with Amrubicin for Advanced Lung Cancer Patients; *Anticancer Res* 2006; 26: 2479-85.
7. Hyodo I, Shirao K, Doi T, Hatake K, Arai Y, Yamaguchi K, Tamura T, Takemiya S, Takiuchi H, Nakagawa K, and Mishima H. A phase II Study of the global dose and schedule of capecitabine in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2006; 36: 410-17.
8. Yamamoto N, Nakagawa K, Uejima H, Sugiura T, Takada Y, Negoro S, Matsui K, Kashii T, Takada M, Nakanishi Y, Kato T, and Fukuoka M. Randomized Phase II study of Carboplatin/Gemcitabine versus Vinorelbine/Gemcitabine in Patients With Advanced Nonsmall Cell Lung Cancer. *West Japan Thoracic Oncology Group(WJTOG) 0104. Cancer* 2006; 107: 599-605.
9. Kudoh S, Takeda K, Nakagawa K, Takada M, Katakami N, Matsui K, Shinkai T, Sawa T, Goto I, Semba H, Seto T, Ando M, Satoh T, Yoshimura N, Negoro S, and Fukuoka M. Phase III study of docetaxel compared with vinorelbine in elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of the West Japan Thoracic Oncology Group Trial (WJTOG 9904). *J Clin Oncol* 2006; 24: 3657-63.
10. Yamamoto N, Nishimura Y, Nakagawa K, Matsui K, and Fukuoka M. Phase I/II study of weekly docetaxel dose escalation in combination with fixed weekly cisplatin and concurrent thoracic radiotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 58: 285-91.
11. Kurata T, Matsuo K, Takada M, Kawahara M, Tsuji M, Matsubara Y, Otani N, Matsuyama S, Muraishi K, Fujita T, Ishikawa M, Koyano K., Okamoto I, Satoh T, Tamura K, Nakagawa K, and Fukuoka M. Is the Importance of Achieving Stable Disease Different between Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors and Cytotoxic Agents in the Second-Line Setting for Advanced Non-small Cell Lung Cancer? *Journal of Thoracic Oncology* 2006; 1: 684-91.
12. Saito H, Kudoh S, Nakagawa K, Negoro S, Matsui K, Semba H, and Takada M. Phase II study of 3-week scheduling of irinotecan in combination with cisplatin in patients with advanced nonsmall-cell lung cancer. *Am J Clin Oncol* 2006; 29: 503-07.
13. Saito H, Takada Y, Ichinose Y, Eguchi K, Kudoh S, Matsui K, Nakagawa K, Takada M, Negoro S, Tamura K, Ando M, Tada T, and Fukuoka M. Phase II Study of Etoposide and Cisplatin With Concurrent Twice-Daily Thoracic Radiotherapy Followed by Irinotecan and Cisplatin in Patients With Limited-Disease Small-Cell Lung Cancer: *West Japan Thoracic Oncology Group 9902. J Clin Oncol* 2006; 20: 5247-52.
14. Kurata T, Tamura K, Okamoto I, Satoh T, Nakagawa K,

and Fukuoka M. Pemetrexed-induced edema of the eyelid.  
Lung Cancer 2006; 54: 241-42.

15. Ohe Y, Ohashi Y, Kubota K, Tamura T, Nakagawa K, Negoro S, Nishiwaki Y, Saijo N, Ariyoshi Y, and Fukuoka M. Randomized phase III study of cisplatin plus irinotecan versus carboplatin plus paclitaxel, cisplatin plus gemcitabine, and cisplatin plus vinorelbine for advanced non-small-cell lung cancer: Four-Arm Cooperative Study in Japan. Ann Oncol 2007; 18: 317-33.

16. Okabe T, Okamoto I, Tamura K, Terashima M, Yoshida T, Satoh T, Takada M, Fukuoka M, and Nakagawa K. Differential Constitutive Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor in Non-Small Cell Lung Cancer Cells Bearing EGFR Gene Mutation and Amplification. Cancer Res 2007; 67(5); 2046-53.

17. Shimizu T, Satoh T, Tamura K, Ozaki T, Okamoto I, Fukuoka M, and Nakagawa K. Oxaliplatin / fluorouracil / leucovorin (FOLFOX4 and modified FOLFOX6) in patients with refractory or advanced colorectal cancer: Post approval Japanese population experience. Int J Clin Oncol 2007; in press.

18. Tamura K, Nakagawa K, Kurata T, Satoh T, Nogami T, Takeda K, Mitsuoka S, Yoshimura N, Kudoh S, Negoro S, and Fukuoka M. Phase I study of TZT-1027, a novel synthetic dolastatin 10 derivative and inhibitor of tubulin polymerization, which was administered to patients with advanced solid tumors on days 1 and 8 in 3-week courses. Cancer Chemother Pharmacol 2007; in press.

19. Ikeda M, Okamoto I, Tamura K, Satoh T, Yonesaka K, Fukuoka M, and Nakagawa K. Down-regulation of survivin by ultraviolet C radiation is dependent on p53 and results in G(2)-M arrest in A549 cells. Cancer Lett 2007; 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

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

進行肺がん患者を対象として、抗がん剤投与前後のCEC、CEP値を測定した。肺がん患者においては、CEC、CEP値は正常人に比較して有意に高値を示した。CBDCA+PTX（CP）の併用療法においてCEC、CEP値は、PR、SD群が前値で有意に高値を示したが、S-1療法においては、効果との間に明らかな相関は認められなかった。以上よりCEC、CEP値が肺がんCP治療の効果予測バイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年血管新生阻害薬の臨床的有用性、併用による既存薬剤の効果増強が示されるとともに、これらの薬効を証明する、あるいは効果を予測するバイオマーカーの特定が望まれている。また腫瘍の血管性は予後や抗がん剤の感受性に関わることから、我々は循環血液中の血管内皮細胞であるCEC（Circulating Endothelial Cell）あるいは前駆細胞のCEP（Circulating Endothelial Progenitor）を化学療法の前後で測定し、治療効果、その他の臨床情報との関連性を解析し、これらがバイオマーカーとして有用かどうかの検証をおこなった。

B. 研究方法

進行性肺がん患者を対象として下記レジメンの抗がん剤投与前後にCEC、CEP値を測定した。

- ・ 初回治療 Carboplatin+Paclitaxel (CP)  
pre, day8, 22 CEC, CEP
- ・ 再発治療 S-1  
pre, day8, 28 CEC

CECはCD146(+), CD105(+), CD45(-)で定義し、マグネットビーズ法を用いて、CEPはCD45(-), CD34(+), CD133(+))で定義し、フローサイトメトリーを用いて測定を行い、それぞれの値と効果などの臨床情報との関連性を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は遺伝子情報、ゲノム解析は行わない。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、連結した臨床情報、CEC、CEP情報が第三者に渡ることはない。症例登録後、すべての検体は符号化され、番号のみで取り扱い、情報管理に留意した。個人識別情報（氏名、住所など）が漏洩することはないことであるが、万一流出するようなことがあったとしても測定する末梢血液中のCEC、CEPは健

常人からも検出されるため、患者の不利益になる可能性は極めて少ない。

C. 研究結果

すべての症例（CP; n=31, S-1群; n=27）においてCEC、CEPの測定は評価可能であった。肺がん患者におけるCECの前値はCP療法群で595±832/4ml、S-1療法群で121±120/4mlと、健常成人44±47/4mlに比較して有意に高値であった。CEC値はCP療法群において、腺がんで扁平上皮がんより有意に高値であったが、性別、病期、PS、喫煙歴などでは差が認められなかった。腫瘍体積とCEC値の比較では、いずれの治療群においても明らかな相関はみられなかった。治療前後のCEC値の変動の検討では、CP群、S-1群いずれにおいても治療後低下する傾向を認めたが（下記参照）、その傾向はCP群でより顕著であった。CP療

CEC値の変動

CP群: 176±22/4ml (day8, p<0.05)、173±189/4ml (day22, p<0.05)

S-1群: 110±118/4ml (day8, n.s.), 71.2±53.1/4ml (day28, p<0.05)

法におけるCEP値の治療後day8、28における変動は、day8でいったん低下した後、day22で前値のレベルまで回復する傾向が観察され（下記参照）、CECとは

CEP値の変動

前値: 69.6±73.4/ml

Day8: 10.4±12.7/ml (p<0.05)

Day28: 87.8±76.4/ml (n.s.)

違う挙動がみられた。CEPが骨髄由来の細胞であることから、末梢血中の白血球、好中球値との関連を検討したところ、白血球数は多くの症例で抗がん剤による骨髄抑制がday8でみられ、その変動はCEPに類似していた。治療効果との関連ではCP療法においてCEC、CEP前値は、PR、SD患者群ではPD群に比較して有意に高い結果であった（下記参照）。

## 治療効果との関連

### ・ CEC

PR, SD群: 687±902/4ml

PD群: 211±150/4ml (p<0.05)

### ・ CEP

PR, SD群: 98.3±74.4/ml

PD群: 15.3±1.9/ml (p<0.05)

一方、S-1療法においては、CEC、CEP値と効果の間に明らかな関連は認められなかった。その他CP療法のPD群はCEC、CEP値が治療後day8にいったん低下後、day28には前値まで回復、または前値より増加する傾向を認めた。

## D. 考察

今回の結果から、末梢血中のCEC、CEPがCP療法の効果予測マーカーとなりうる可能性が示された。S-1療法において同様の結果が得られなかった理由として、S-1が再発治療であること、薬の違い（Paclitaxelは強い血管内皮細胞障害作用を持つ）などが考えられる。またCEPは白血球数の変動に類似した挙動を示したため、測定タイミングを含めて、本バイオマーカーの有用性をさらに検証する必要があると考えられた。今後はVEGFR-2阻害剤、抗VEGFR抗体等も含めた薬物療法における、CEC、CEPの意義についても検討をすすめていく予定である。

## E. 結論

進行性肺がん患者の化学療法前後のCEC、CEP値を測定して、臨床情報との関連性を解析した。すべての症例においてCEC、CEPの評価は可能であり、Carboplatin±Paclitaxelの初回治療患者においてPR、SD群で前値が有意に高値であった。CEC、CEPが初回肺がん化学療法（CP療法）の効果予測バイオマーカーとなる可能性が示された。

## F. 研究発表

1. Fujisaka Y, Horiike A, Shimizu T, Yamamoto N, Yamada Y, Tamura T. Phase 1 Clinical Study of Pegylated Liposomal Doxorubicin (JNS002) in Japanese Patients with Solid Tumors. *Jpn J Clin Oncol*. 2006; 36(12): 768-74.
2. Tamura T, Minami H, Yamada Y, Yamamoto N, Shimoyama T, Murakami H, Horiike A, Fujisaka Y, Shinkai T, Tahara M, Kawada K, Ebi H, Sasaki Y, Jiang H, Saijo N. A phase I dose-escalation study of ZD6474 in Japanese patients with solid, malignant tumors. *J Thorac Oncol*. 2006; 1(9): 1002-1009.
3. Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunitoh H, Tamura T, Kasahara K, Nishio K. EGFR mutation status in

tumour-derived DNA from pleural effusion fluid is a practical basis for predicting the response to gefitinib. *Br J Cancer*. 2006; 95: 1390-1395.

4. Sekine I, Takada M, Nokihara H, Yamamoto S, Tamura T. Knowledge of efficacy of treatments in lung cancer is not enough, their clinical effectiveness should also be known. *J Thorac Oncol*. 2006; 1: 398-402.
5. Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunitoh H, Tamura T, Kasahara K, Nishio K. High sensitivity detection of epidermal growth factor receptor mutations in the pleural effusion of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Sci*. 2006; 97(7): 642-8.
6. Kimura H, Kasahara K, Kawaiishi M, Kunitoh H, Tamura T, Holloway B, Nishio K. Detection of 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*. 2006; 12(13): 3915-21.
7. Yamada Y, Tamura T, Yamamoto N, Shimoyama T, Ueda Y, Murakami H, Kusaba H, Kamiya Y, Saka H, Tanigawara Y, McGovren JP, Natsumeda Y. Phase I and pharmacokinetic study of edotecarin, a novel topoisomerase I inhibitor, administered once every 3 weeks in patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006; 58(2): 173-82.
8. Sakai K, Yokote H, Murakami-Murofushi K, Tamura T, Saijo N, Nishio K. In-frame deletion in the EGF receptor alters kinase inhibition by gefitinib. *Biochem J*. 2006; 397(3): 537-43.
9. Sakai K, Arao T, Shimoyama T, Murofushi K, Sekijima M, Kaji N, Tamura T, Saijo N, Nishio K. Dimerization and the signal transduction pathway of a small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor. *FASEB J*. 2006; 20(2): 311-3.
10. Sekine I, Minna D, Nishio K, Tamura T, Saijo N. A literature review of molecular markers predictive of clinical response to cytotoxic chemotherapy in patients with lung cancer. *J Thoracic Oncol*. 2006; 1: 31-37.

## 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

分子標的薬物の効率的な臨床評価法に関する研究

分担研究者 南 博信（国立がんセンター東病院化学療法科医長）

研究要旨

Sorafenib は Raf キナーゼおよび VEGF 受容体チロシンキナーゼの阻害作用を有する分子標的薬である。前臨床試験の結果から副作用は軽微であるが、抗腫瘍効果は増殖抑制であると考えられた。日本人における sorafenib の第 I 相試験において biomarker を探索した。FDG-PET により代謝能を評価したところ、治療により代謝能は低下し clinical benefit と相関した。一方、前臨床試験で sorafenib の biomarker となる可能性が示唆された末梢血単核球における pERK/CD3 細胞比や adrenomedullin は有意の変化を示さなかった。

A. 研究目的

Sorafenib は Raf キナーゼや VEGF 受容体チロシンキナーゼなどの阻害作用を有する分子標的薬である。日本人で実施した第 I 相試験において sorafenib の biomarker を探索する目的で、糖代謝能を反映する FDG-PET、末梢血単核球における pERK/CD3 細胞比や adrenomedullin を用いて本薬の生物学的活性を検討した。

B. 研究方法

各種固形がん患者を対象として、1 回 100 mg より 200、400、600 mg と増量した。抗腫瘍効果の評価は治療開始前、開始 1、2ヶ月後、および以後 2ヶ月毎に CT を実施し、partial response (PR)、stable disease (SD)、progressive disease (PD) に分類した。同時期に FDG-PET を施行し standardized uptake value (SUV) を測定した。その際、SUV に影響を与える食事、

血糖値、FDG 投与から撮像までの時間などを統一した。SUV による効果判定は、EORTC から提唱されている 25% 以上の SUV の低下を基準とした。合わせて、前臨床試験で sorafenib の biomarker となる可能性が示唆された末梢血単核球における pERK/CD3 細胞比や adrenomedullin 濃度を測定した。

（倫理面への配慮）

Sorafenib の第 I 相試験、および分子標的治療薬の PET による評価の臨床研究の試験計画書をそれぞれ受託研究審査委員会、倫理審査委員会で審査の上承認を得た。書面でインフォームドコンセントが得られた患者のみを対象とした。

C. 研究結果

1 回投与量として 100 mg、200、400、600 mg の各用量でそれぞれ、3、15、6、7

例、合計 31 例を治療した。主な副作用は、発疹/落屑、手足皮膚反応、下痢、リパーゼ上昇などであったが、いずれも容易に管理可能であった。グレード 3 以上のリパーゼ上昇が 7 例、アミラーゼ上昇が 3 例にみられたが、膵炎を起こした患者はいなかった。

薬物動態の個体間差は大きかったが、AUC および C<sub>max</sub> は用量に依存して増大した。推奨用量の 400 mg で前臨床試験での IC<sub>50</sub> を越える血漿中トラフ濃度が得られた。非小細胞肺癌 10 例中 PR が 1 例、24 週以上持続する SD が 5 例に見られ、腎癌 3 例中 1 例で PR が得られた。

FDG-PET を 23 例（非小細胞肺癌 7 例、大腸癌 6 例、腎癌 2 例、その他 8 例）で施行した。Clinical benefit が得られた 7 例（PR 1 例、4 ヶ月以上の SD が得られた 6 例）のうち 6 例で SUV が治療前値と比べて 25% 以上低下し、残りの 1 例でも 23% の SUV の低下を認めた。

また、治療開始 1 ヶ月後の PET で SUV の低下が 25% 未満であった 9 例中、8 例が 2 ヶ月目までに病状の進行などで治療を中止していた。一方、1 ヶ月の段階で SUV が 25% 以上減少した 11 例では 5 例のみが 2 ヶ月以内に治療を中止していただいただけであった。

血清中 Adrenomedullin 濃度を連日投与開始 14 および 28 日目に測定したが、投与前と比べて変化していなかった。また投与開始 28 目の末梢血単核球 pERK/CD3 比も投与前から低下していなかった。

#### D. 考察

4 ヶ月以上の SD や PR といった、いわゆる clinical benefit が期待できる 9 例では FDG-PET により測定した SUV が低下し、8 例で 25% 以上の低下を示していた。分子標

的薬物は長期間の SD が薬効として期待されているが、SUV はそれを早期に検出できる可能性が示唆される。分子標的薬の生物学的活性を PET で評価できる可能性を示しているものと考えられた。一方、前臨床試験の結果より sorafenib の biomarker となると期待された末梢血単核球における pERK/CD3 細胞比や adrenomedullin は有意に変化しておらず、biomarker としては不適切であることが示唆された。

#### E. 結論

Sorafenib の第 I 相試験において biomarker を探索した結果、FDG-PET で腫瘍の代謝能を評価することは抗腫瘍効果を早期に検出する可能性が示唆されたが、末梢血単核球における pERK/CD3 細胞比や adrenomedullin は biomarker とは不適切であった。第 II 相試験あるいは第 III 相試験など均一な臨床条件のもとで FDG-PET による SUV 測定の意義を評価する必要がある。

#### F. 研究発表

1. Tobinai K, Watanabe T, Ogura M, Morishima Y, Ogawa Y, Ishizawa K, Minami H, Utsunomiya A, Taniwaki M, Terauchi T, Nawano S, Matsusako M, Matsuno Y, Nakamura S, Mori S, Ohashi Y, Hayashi M, Seriu T, Hotta T. Phase II study of oral fludarabine phosphate in relapsed indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma. J Clin Oncol 24: 174-180, 2006
2. Saeki M, Saito Y, Jinno H, Sai K, Ozawa S, Kurose K, Kaniwa N, Komamura K, Kotake T, Morishita H, Kamakura S, Kitakaze M, Tomoike H, Shirao K, Tamura T, Yamamoto N, Kunitoh H, Hamaguchi T,

- Yoshida T, Kubota K, Ohtsu A, Muto M, Minami H, Saijo N, Kamatani N, Sawada J. Haplotype structures of the *UGT1A* gene complex in a Japanese population. *Pharmacogenomics* 6: 63-75, 2006
3. Ogawa Y, Hotta T, Tobinai K, Watanabe T, Sasaki Y, Minami H, Morishima Y, Ogura M, Seriu T. Phase I and pharmacokinetic study of oral fludarabine phosphate in relapsed indolent B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 17: 330-333, 2006
  4. Minami H, Kawada K, Sasaki Y, Igarashi T, Saeki T, Tahara M, Itoh K, Fujii H. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of protein-unbound docetaxel in cancer patients *Cancer Science* 97: 235-241, 2006
  5. Araki K, Sangai T, Miyamoto S, Meda H, Zhang S, Nakamura M, Ishii G, Hasebe T, Kusaka H, Akiyama T, Tokuda Y, Nagai K, Minami H, Ochiai A. Inhibition of bone-derived insulin-like growth factors by a ligand specific antibody suppresses the growth of human multiple myeloma in the human adult bone explanted in NOD/SCID mouse. *Int J Cancer* 118: 2602-2608, 2006
  6. Maekawa K, Itoda M, Sai K, Saito Y, Kaniwa N, Shirao K, Hamaguchi T, Kunitoh H, Yamamoto N, Tamura T, Minami H, Kubota K, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Kamatani N, Ozawa S, Sawada J. Genetic variations and haplotype structure of the ABC transporter gene *ABCG2* in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokin* 21: 109-121, 2006
  7. Kim SR, Saito Y, Maekawa K, Kaniwa N, Ueno H, Okusaka T, Morizane C, Yamamoto N, Ikeda M, Yoshida T, Minami H, Furuse J, Ishii H, Saijo N, Kamatani N, Ozawa S, Sawada J. Thirty novel genetic variations in the *SLC29A1* gene encoding human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). *Drug Metab Pharmacokin* 21: 248-256, 2006
  8. Nakajima Y, Yoshitani T, Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Kaniwa N, Kurose K, Ozawa S, Aoyagi N, Kamatani N, Yamamoto N, Kunitoh H, Ohe Y, Tamura T, Yoshida T, Minami H, Saijo N, Katori N, Sawada J. Impact of the haplotype *CYP3A4\*16B* harboring the Thr185Ser substitution on paclitaxel metabolism in Japanese cancer patients. *Clin Pharmacol Ther* 80: 179-191, 2006
  9. Sai K, Itoda M, Saito Y, Kurose K, Katori N, Kaniwa N, Komamura K, Kamakura S, Kitakaze M, Tamura T, Yamamoto N, Kunitoh H, Yamada Y, Ohe Y, Shimada Y, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Kamatani N, Ozawa S, Sawada J. Genetic variations and haplotype structures of the *ABCB1* gene in a Japanese population: an expanded haplotype block covering the distal promoter region and its ethnic differences *Ann Hum Genet* 70: 605-622, 2006
  10. Yoh K, Tahara M, Kawada K,

- Mukai H, Nakata M, Itoh K, Kawashima M, Nishimura H, Hayashi R, Ogino T, Minami H. Chemotherapy in the treatment of advanced or recurrent olfactory neuroblastoma. *Asia-Pacific J Clin Oncol* 2:180-184, 2006
11. Tamura T, Minami H, Yamada Y, Yamamoto N, Shimoyama T, Murakami H, Horiike A, Fujisaka Y, Shinkai T, Tahara M, Kawada K, Ebi H, Sasaki Y, Haiyi J, Saijo N. A phase I dose-escalation study of ZD6474 in Japanese patients with solid malignant tumors. *J Thoracic Oncol* 1: 1002-1009, 2006
  12. Morishima Y, Ogura M, Yoneda S, Sakai H, Tobinai K, Nishiwaki Y, Minami H, Hotta T, Ezaki K, Ohe Y, Yokoyama A, Tsuboi M, Mori K, Watanabe K, Ohashi Y, Hirashima K, Saijo N, Japan Erythropoietin Study Group. Once-weekly epoetin beta improves hemoglobin levels in cancer patients with chemotherapy-induced anemia. A randomized, double-blind, dose-finding study. *Jpn J Clin Oncol* 36: 655-661, 2006
  13. Kawada K, Murakami K, Sato T, Kojima Y, Ebi H, Mukai H, Tahara M, K Shimokata, Minami H. Prospective study of positron emission tomography for evaluation of the activity of lapatinib, a dual inhibitor of the ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, in patients with advanced tumors. *Jpn J Clin Oncol* 37: 44-48, 2007
  14. Akechi T, Taniguchi K, Suzuki K, Okamura M, Minami H, Okuyama T, Furukawa TA, Uchitomi Y. Multifaceted psychosocial intervention program for breast cancer patients after first recurrence: feasibility study. *Psycho-Oncology* (in press)
  15. Saeki T, Nomizu T, Toi M, Ito Y, Noguchi S, Kobayashi T, Asaga T, Minami H, Yamamoto N, Aogi K, Ikeda T, Ohashi Y, Sato W, Tsuruo T. Dofequidar fumarate (MS-209) in combination with cyclophosphamide, doxorubicin and 5-fluorouracil for patients with advanced or recurrent breast cancer. *J Clin Oncol* (in press)
  16. Minami H, Sai K, Saeki M, Saito Y, Ozawa S, Suzuki K, Kaniwa N, Sawada J, Hamaguchi T, Yamamoto N, Shirao K, Yamada Y, Ohmatsu H, Kubota K, Yoshida T, Ohtsu A, Saijo N. Irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics and *UGT1A1* genetic polymorphisms in Japanese: Roles of *UGT1A1\*6* and *\*28*. *Pharmacogenetics Genomics* (in press)
  17. Nakajima M, Komagata S, Fujiki Y, Kanada Y, Ebi H, Itoh K, Mukai H, Yokoi T, Minami H. Genetic polymorphisms of CYP2B6 affect the pharmacokinetics/pharmacodynamics of cyclophosphamide in Japanese cancer patients. *Pharmacogenetics Genomics* (in press)
  18. Saito Y, Katori N, Soyama A, Nakajima Y, Yoshitani T, Kim S-R, Fukushima-Uesaka H, Kurose K, Kaniwa N, Ozawa S, Kamatani N,

Komamura K, Kamakura S, Kitakaze M, Tomoike H, Sugai K, Minami N, Kimura H, Goto Y, Minami H, Yoshida T, Kunitoh H, Ohe Y, Yamamoto N, Tamura T, Saijo N, Sawada J. *CYP2C8* haplotype structures and their influence on pharmacokinetics of paclitaxel in a Japanese population. Pharmacogenetics Genomics (in press)

G. 知的所有権の取得状況

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（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

乳癌を対象にした分子標的治療薬

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

乳癌の腫瘍特性に対応した治療法の開発を目的として、分子標的治療薬、抗HER2療法、に関する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、同時に治療効果増強を目指した基礎的臨床的研究を施行した。抗HER2療法を施行したHER2陽性の再発乳癌患者を対象に、乳癌組織中のHER family蛋白の発現を検索し、抗HER2療法施行後の生存との関連性を検討したが、HER2蛋白の重合性と予後との間に有意の相関関係が認められた。将来の、抗HER2療法の最適化、個別化に極めて有用であると考えられる。

次に、抗HER2抗体の効果増強を目的として、フコース除去トラスツズマブを作成し、癌抗体療法の作用機序のひとつと考えられる抗体依存性細胞障害活性に及ぼす影響を検討した。乳癌患者血液を用いた検討において、ヒト乳癌細胞障害活性はフコース除去により有意に増強された。一連の結果は今後の乳癌における分子標的治療の発展を図る上で有用と考えられる。

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の最適化並びに治療効果増強を目指した研究を遂行する。

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) フコース除去トラスツズマブ：Her2過剰発現乳がんに対するトラスツズマブ単剤の治療効果は30%前後であり、治療効果のさらなる改善が望まれる。フコースをリツキシマブから除去すると癌抗体療法の作用機序のひとつと考えられている抗体依存性細胞障害活性(ADCC)を高めることが確認されている。今回フコース除去トラスツズマブを開発しそのADCC活性を測定した。(倫理面への配慮)いずれの研究課題も厚生労働省の臨床研究に関する倫理指針に則り、東京都立駒込病院倫理委員会の承認を得た上で遂行した。

## C 研究結果

1) 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) 同意の得られた乳がん患者 20 例並びに健常者 10 例の末梢血単核球 (PBMC) を effector cell として、ヒト乳癌細胞株を target cell として用い、フコース除去ならびに通常型トラスツズマブの ADCC 活性を測定、比較検討した。フコース除去トラスツズマブの ADCC 活性は通常型トラスツズマブのそれと比較して有意に高値であった。また化学療法非施行例においてどちらの抗体においても ADCC は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。

## 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 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、今回新たに示したフコース除去トラスツズマブは従来のトラスツズマブの治療効果を改善する可能性が期待される画期的な研究であるといえる。

## E 結論

乳癌を対象に、eTag assay 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、また従来型のトラスツズマブの効果を改善する可能性のあるフコース除去トラスツズマブについて検討した。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ならびに治療方法へと発展することが期待される。

## F 研究発表

1. Toi M, Iino Y. Who benefits from hormone therapy? Breast Cancer 13:117-122, 2006.
2. Dewan MZ, Ahmed S, Iwasaki Y, Ohba K, Toi M, Yamamoto N. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer. Biomed Pharmacother 60:273-276, 2006.
3. 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 13:38-48, 2006.
4. Suzuki T, Toi M, Saji S, Horiguchi K, Aruga T, Suzuki E, Horiguchi S, Funata N, Karasawa K, Kamata N. Early breast cancer. Int J Clin Oncol

11:108-119, 2006.

Oncology Rep 15:653-659, 2006.

5. Yamaguchi T, Bando H, Mori T, Takahashi K, Matsumoto H, Yasutome M, Herbert W, Toi M. Overexpression of soluble vascular endothelial growth factor receptor in colorectal cancer: Association with progression and prognosis. *Cancer Science* 2007 Feb;98(2):219-25.
6. Dewan D, Dewan MZ, Terunuma H, Takada M, Tanaka Y, Abe H, Sata T, Toi M. Role of natural killer cells in hormone-dependent rapid tumor formation and spontaneous metastasis of breast cancer cells in vivo. *Breast Cancer Res Treat* (Accepted).
7. Dewan MZ, Terunuma M, Toi M, Tanaka Y, Katano H, Deng X, Abe H, Nakasone T, Mori N, Sata T, Yamamoto N. Potential role of natural killer cells in controlling growth and infiltration of AIDS-associated primary effusion lymphoma cells. *Cancer Sci*. 97:1381-1387, 2006.
8. Ueno T, Chow LW, Toi M. Increases in circulating VEGF levels during COX-2 inhibitor treatment in breast cancer patients. *Biomed Pharmacother* 60:277-279, 2006. 2006.
9. 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* 12:264-272, 2006.
10. 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.
11. Dewan MZ, 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* 107:716-724, 2006.

抗がん剤の分子標的評価と最適化研究

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

細胞周期阻害剤(G1期停止剤)phosmidosine-Etのさらなる構造活性相関研究の結果、分子内のホスホアミダート結合をスルファモイル基へ変換した類縁化合物が同程度の生理活性を有することを明らかにした。一方、ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)がコードするタンパク質の1つであるVpr(viral protein R)を分子標的とする抗がん剤・抗エイズ薬のリード化合物の探索研究を行った結果、血管新生阻害剤フマギリンがVprの機能を抑制す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、細胞周期やアポトーシスの制御異常によってがん化が引き起こされると考えられ、これらを制御する低分子化合物は、基礎的な研究試薬(バイオプローブ)としてだけでなく、抗がん剤のリード化合物として極めて有望である。そこで、細胞周期やアポトーシスを制御する新規生理活性物質の詳細な化学的解析、化学生物学的解析(ケミカルバイオロジー)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

1. 細胞周期阻害剤(G1期停止剤) phosmidosine-Etの構造活性相関研究を行う過程で、本年度は、分子内のホスホアミダート結合に着目し、ホスホアミダート結合をスルファモイル基へ変換した各種類縁化合物の活性を評価した。
2. Vpr 機能抑制物質の簡便なスクリーニング系を構築し、微生物二次代謝産物を用いてスクリーニングを行った。
3. Vpr 機能阻害剤として見出した血管新生阻害剤フマギリンが、細胞レベルでVpr機能に与える影響を検討した。

(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. Phosmidosine-Etのホスホアミダート結合をスルファモイル基へ変換した5'-O-スルファモイル-8-オキソアデノシンは、phosmidosine-Etと同程度に、v-src<sup>15</sup>-NRK細胞において正常様形態変化、およびG1期停止作用を有することが明らかになった。

2. Vpr発現の誘導により増殖停止を起こす出芽酵母を利用し、Vpr阻害作用を有する薬剤の簡便なスクリーニング系を構築した。スクリーニングの結果、Vpr機能阻害剤としてフマギリンを見出した。
3. VprはHeLa細胞の細胞周期をG2期で停止させるが、フマギリンはこのVprの作用を抑制した。さらに、フマギリンは、Vpr活性が必要であることが明らかになっているマクロファージへのエイズウイルス感染も阻害した。

D. 考察

1. 5'-O-スルファモイル-8-オキソアデノシンがphosmidosine-Etとほぼ同程度の生理活性を示したことから、スルファモイル基の活性発現への重要性が示唆された。
2. 既にカボシ肉腫を有するエイズ患者へのフマギリンの臨床試験が行われ効果が報告されているが、フマギリンのVpr機能阻害という新規なメカニズムも薬効に影響している可能性が示唆される。

E. 結論

細胞周期阻害剤(G1期停止剤)phosmidosine-Etのさらなる構造活性相関研究の結果、分子内のホスホアミダート結合をスルファモイル基へ変換した類縁化合物が同程度の生理活性を有することを明らかにした。血管新生阻害剤フマギリンが、後天性免疫不全症候群(HIV)の原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)がコードするタンパク質の1つであるVpr(viral protein R)の機能を抑制したことから、新しい抗がん剤・抗エイズ薬のリード化合物になりうる可能性が示された。

F. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. Taguchi, H., Ohkubo, A., Sekine, M., Seio, K., Takeya, H., Osada, H., Sasaki, T. Synthesis

- and biological properties of new phosmidosine analogs having an N-acylsulfamate linkage. *Nucleos. Nucleot. Nucl.* 25, 647-654 (2006).
2. Watanabe, N., Nishihara, Y., Yamaguchi, T., Koito, A., Miyoshi, H., Takeya, H., Osada, H. Fumagillin suppresses HIV-1 infection of macrophages through the inhibition of VPR activity. *FEBS Lett.* 580, 2598-2602 (2006).
  3. Matsuzawa, M., Takeya, H., Yamaguchi, J., Shoji, M., Onose, R., Osada, H., Hayashi, Y. Enantio- and diastereoselective total synthesis of (+)-panepophenanthrin, an ubiquitin-activating enzyme inhibitor, and biological properties of its new derivatives. *Chem. Asian. J.* 1, 845-851 (2006).
  4. Shiina, I., Uchimaru, T., Shoji, M., Takeya, H., Osada, H., Hayashi, Y. Computational study on the reaction mechanism of the key thermal [4+4] cycloaddition reaction in the biosynthesis of epoxytwinol A. *Org. Lett.* 8, 1041-1044 (2006).
  5. Yamaguchi, J., Toyoshima, M., Shoji, M., Takeya, H., Osada, H., Hayashi, Y. Concise, enantio- and diastereo-selective total syntheses of fumagillol, RK-805, FR65814, ovalicin and 5-demethylovalicin, using the proline-mediated, catalytic, asymmetric  $\alpha$ -aminooxylation. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 789-793 (2006).

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

分子標的薬を含む薬物治療の最適化の基盤研究

分担研究者 桑野 信彦

久留米大学・先端癌治療研究センター・教授

研究要旨：

薬物療法の最適化と関連して YB-1 のグローバル薬剤耐性への関与に関する基礎ならびに分子病理学研究を進めた。さらに Cap43/NDRG1 と腫瘍関連マクロファージについてがんの悪性進展への働きについて明らかにした。

A. 研究目的

がんの薬物療法の最適化と新しい導入に関して我々は、

1. がん薬物療法の効果また感受性を制御する分子標的として YB-1, Cap43/NDRG1 ならびに EGFR ファミリーに注目し、臨床的に有用性のある標的を提示する。
2. がんの間質における炎症反応と関連した腫瘍関連マクロファージならびに転移抑制遺伝子 Cap43/NDRG1 を標的としたがん治療を考案する。

B. 研究方法

1. がん薬物療法の感受性を制御する標的分子に関する解析において

- (1) YB-1 siRNA 処理の乳癌、肺癌や卵巣癌細胞で関連蛋白質の発現の変化を定量的 RT-PCR, ウェスタンブロットならびに共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫細胞染色法で検討する。
- (2) 免疫組織染色法を用いてヒト乳癌、胃癌、大腸癌、肺癌、舌癌、卵巣癌などの病理材料を対象に、YB-1 の Cap43/NDRG1 の発現を解析する。臨床病理パラメーターや抗がん剤感受性や癌進展の標的分子発現との相関について生物統計学的に解析を進める。

2. がんの新しい治療を導入する仕事に関する解析において、

- (1) Cap43/NDRG1 の役割を明らかにするために Cap43 siRNA や cDNA を導入して発現が低下または上

昇したヒト膀胱癌や乳癌細胞株を樹立した。

- (2) ノドマウスを用いてヒトがん細胞を皮下移植して腫瘍の大きさや微小血管密度などを測定した。血管新生能はマウス角膜法を、がん血管新生能についてはマウス背部皮下法で検討した。

（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 文部科学省・厚生省・経済産業省告示第 1 号）を遵守する。

C. 研究結果

1. がん薬物療法の感受性の制御に関して次の結果を得た。

- (1) YB-1： YB-1 の核内局在が乳癌、骨肉腫、肺癌やその他の癌種のがん患者の予後因子であることの原因として P-糖蛋白質依存性の耐性獲得以外にがん増殖にも深く関与するのではないかと考えた。そこで、YB-1 の核内移行への Akt の関与を明らかにし、YB-1 ノックダウンのヒト卵巣癌や乳癌細胞で Microarray/QRT-PCR で変動する遺伝子群の中から増殖関連遺伝子を同定した。さらに卵巣癌と乳癌の病理検体を対象に YB-1 の核内局在と関連する増殖やホルモン応答遺伝子を同定した。

- (2) Cap43/NDRG1： エストラジオール受容体（ER）陽性のヒト乳癌細胞では Cap43 遺伝子はエストラジ

オール (E<sub>2</sub>) によって著明に発現が抑制され、タモキシフェンなどの抗ホルモン剤の併用でその抑制を克服した。さらに乳癌患者を対象にした免疫組織染色 (IHC) の結果、ER $\alpha$  の発現と Cap43 の発現は有意な逆相関を示した。

2. がん間質を標的とした新しいがん薬物療法の導入に関して次の結果を得た。

(1) Cap43/NDRG1 : ヒト膵癌において、Cap43 の発現上昇は培養系の細胞増殖には影響を与えないが腫瘍増大や血管新生を著明に低下させ、VEGF や IL-8 などの血管新生因子の発現が有意に抑制された。さらに Cap43 はヒト膵癌の微小新生血管密度とも逆相関した。

(2) 腫瘍関連マクロファージ : 間質応答の中でも炎症反応や腫瘍関連マクロファージの集積について、炎症応答性の血管新生に単球/マクロファージが関与していることを見出した。すなわち MCP-1 のノックアウトやマクロファージ標的のリポソーム・ビスホスホネート処理によって炎症性血管新生が著明に阻害された。さらにマクロファージ標的薬剤の投与によりがんの増大と血管新生が著明に阻害されることと、がん細胞の骨転移を抑制することを見出しつつある。

#### D. 考察

がん薬物療法の最適化と関連して我々が注目している標的分子 YB-1 の核内局在や発現レベルは、P-糖蛋白質発現やシスプラチン障害 DNA の修復と相関し、グローバル薬剤耐性に関与することがほぼ明らかになった。そこでさらに、薬物療法効果のバイオマーカーになるか否かがこれからの重要な課題である。他方、がんの新しい薬物療法導入と関連して腫瘍関連マクロファージを標的としたリポソーム化ビスホスホネートは炎症性サイトカインで誘導された血管新生を阻害し、腫瘍の増大を阻害することを見出した。今後、腫瘍関連マクロファージに特異的なバイオマーカーを同定して特異性の高い治療法を考案していきたい。

#### E. 結論

1. YB-1 の核内局在は Akt シグナルの活性化は必要であるが、薬剤耐性のみならず EGFR ファミリーをは

じめとした増殖レセプターの発現に関与していた。

2. Cap43/NDRG1 は膵癌における血管新生因子や CXC ケモカインの発現を制御しがん血管新生に影響を与え、膵癌患者の予後因子ともなることが示唆された。

3. マクロファージの浸潤は血管新生を含む癌の悪性進展に重要な役割を担っており、マクロファージ標的のがん治療法は重要であることを示した。

#### F. 研究発表

1. Basaki Y, Hosoi F, Oda Y, Fotovati A, Maruyama Y, Oie S, Ono M, Izumi H, Kohno K, Shimoyama T, Nishio K, and Kuwano M. Akt-dependent nuclear localisation of Y-box-binding protein 1 in acquisition of malignant characteristics by human ovarian cancer cells. *Oncogene* in press.

2. Ueda S, Basaki Y, Yoshie M, Ogawa K, Sakisaka S, Kuwano M, and Ono M. PTEN/Akt signaling through epidermal growth factor receptor is prerequisite for angiogenesis by hepatocellular carcinoma cells that is susceptible to inhibition by gefitinib. *Cancer Res.* 2006; 66: 5346-5353.

3. Fotovati A, Fujii T, Yamaguchi M, Kage M, Shirouzu K, Oie S, Basaki Y, Ono M, Yamana H, and Kuwano M. 17 $\beta$ -Estradiol induces downregulation of Cap43/NDRG1/Drg-1, a putative differentiation-related and metastasis suppressor gene, in human breastcancer cells. *Clinic. Cancer Res.* 2006; 12: 3010-3018.

4. Maruyama Y, Ono M, Kawahara A, Yokoyama T, Basaki Y, Kage M, Aoyagi S, Kinoshita H, and Kuwano M. Tumor growth suppression in pancreatic cancer by a putative metastasis suppressor gene Cap43/NDRG1/Drg-1 through modulation of angiogenesis. *Cancer Res.* 2006; 66: 6233-6242.

5. Oie S, Ono M, Yano H, Maruyama Y, Terada T, Yamada Y, Ueno T, Kojiro M, Hirano K, and

Kuwano M. The upregulation of type I interferon receptor gene plays a key role in hepatocellular carcinoma cells in the synergistic antiproliferative effect by 5-fluorouracil and interferon- $\alpha$ . *Int. J. Oncol.* 2006; 29: 1469-1478.

6. Ono M, and Kuwano M. Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor EGFR activation and responses to gefitinib and other EGFR-targeting drugs (CCR Forum). *Clinic. Cancer Res.* 2006; 12: 7242-7251.

7. Aishima S, Basaki Y, Oda Y, Kuroda Y, Nishihara Y, Taguchi K, Taketomi A, Maehara Y, Hosoi F, Maruyama Y, Fotovati A, Oie S, Ono M, Ueno T, Sata M, Yano H, Kojiro M, Kuwano M. and Tsuneyoshi M. High expression of insulin-like growth factor binding protein-3 is correlated with lower portal invasion and better prognosis in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 2006; 97: 1182-1190.

8. Yano H, Ogasawara S, Momosaki S, Akiba J, Kojiro S, Fukahori S, Ishizaki H, Kuratomi K, Basaki Y, Oie S, Kuwano M. and Kojiro M. Growth inhibitory effects of regulated IFN  $\alpha$ -2b on human liver cancer cells in vitro and in vivo. *Liver Int.* 2006; 26: 964-975.

9. Uchiumi T, Fotovati A, Sasaguri T, Shibahara K, Shimada T, Fukuda T, Nakamura T, Izumi H, Tsuzuki T, Kuwano M. and Kohno K. YB-1 is important for an early stage embryonic development: Neural tube formation and cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 40440-40449.

#### G. 知的財産権の出願登録状況

##### 1. 特許取得

特願 2006-213334

骨転移抑制剤

トランスポーターの制御による分子標的治療の開発

分担研究者 杉本 芳一 共立薬科大学教授

研究要旨

抗がん剤排出トランスポーターBCRPの遺伝子の9種のSNPについて、遺伝子導入細胞を作成してその機能を評価した。その結果、BCRPタンパク質が細胞膜上に発現しなく、トランスポーター活性をもたないBCRP-T623C (F208S)、BCRPタンパク質の発現あるいは活性を低下させるBCRP-T1291C (F431L)、BCRP-C458T (T153M)、BCRP-G1858A (D620N) のあわせて4つの機能性SNPsを同定した。

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

B. 研究方法

9種のアミノ酸変異を伴うBCRPのSNP (G151T, C458T, C496G, A616C, T623C, T742C, T1291C, A1768T, G1858A) について、SNP型cDNAを作成してHa-BCRP-IRES-DHFRベクターに組み込み、これをPA317細胞に導入して、SNP型BCRP遺伝子導入細胞を作成した。対象として、野生型BCRP導入細胞および過去に我々が報告したBCRP-G34A、BCRP-C421Aの2種類のSNP型cDNAの導入細胞も同時に作成した(1)。SNPによるアミノ酸変異がBCRPタンパク質の発現と機能に及ぼす影響について解析した。

同様に、MDR1-T3587GのSNPについて、このSNPがコードするI1196S-P-gpの発現と活性について検討した。MCF-7/MDR細胞のP-gpの発現に対するestrogenの影響を調べた。種々のflavonoidがBCRPによる抗がん剤耐性に与える影響について検討した。

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

今回作成した野生型BCRP導入細胞及び11種類のSNP型BCRP導入細胞では、BCRP mRNAの発現はほぼ同じレベルであった。BCRP-T623C (F208S) 導入細胞では、

Western blotにおいてほとんどBCRPタンパクが検出されず、細胞膜上のタンパク発現も認められなかった。また、SN-38に対する感受性は親株のPA317細胞と同程度であった。BCRP-T1291C (F431L) 導入細胞ではWestern blotにおいて糖鎖付加状態が異なると思われる2種類のBCRPタンパクが確認され、SN-38に対する耐性は野生型BCRP導入細胞よりも低下していた。BCRP-C458T (T153M) 導入細胞、BCRP-G1858A (D620N) 導入細胞では野生型BCRP導入細胞よりもBCRPタンパク発現が低下しており、SN-38に対して低レベルの耐性を示した。BCRP-C496G (Q166E) 導入細胞では野生型BCRP導入細胞よりもBCRPタンパク発現が亢進しており、SN-38に高い耐性を示した(4)。

MDR1-T3587G導入細胞について検討し、産生されるI1196S-P-gpが細胞膜上に発現しないこと、およびI1196S-P-gpがATP結合活性をもたないことを見出した(2)。EstrogenがMCF-7/MDR細胞のP-gpの発現を低下させることを見出した(3)。種々のflavonoidがBCRPを競合的に阻害することを見出した(5)。

D. 考察

本研究により、BCRP-T623C (F208S)、BCRP-T1291C (F431L)、BCRP-C458T (T153M)、BCRP-G1858A (D620N) などのSNPをもつヒトでは、正常組織のBCRPの活性が低い可能性が示された。我々が過去に報告したBCRPタンパクの発現を5分の1に低下させるBCRP-C421A (Q141K) については、BCRP-C421A (Q141K) をもつ患者でBCRPにより排出される新規抗がん剤diflomotecanの血中濃度が上昇することが示されており、今回同定した新規機能性SNPについても抗がん剤の体内動態に影響を与える可能性が考えられる。

E. 結論

BCRP遺伝子のSNPの検索とその機能の評価を行い、BCRPタンパク質の発現と活性を消失させるBCRP-T623C

(F208S)、BCRPタンパク質の発現あるいは活性を低下させる *BCRP-T1291C* (F431L)、*BCRP-C458T* (T153M)、*BCRP-G1858A* (D620N) の4つの機能性SNPsを同定した。

#### F. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. Yanase K, Tsukahara S, Mitsuhashi J, and Sugimoto Y. Functional SNPs of the breast cancer resistance protein—therapeutic effects and inhibitor development. *Cancer Letters* 2006; 234: 73-80.
2. 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 germ-line mutation of the *MDR1* gene encodes a nonfunctional P-glycoprotein. *Mol. Cancer Ther.* 2006; 5: 877-884.
3. Mutoh K, Tsukahara S, Mitsuhashi J, Katayama K, and Sugimoto Y. Estrogen-mediated post transcriptional down-regulation of P-glycoprotein in *MDR1*-transduced human breast cancer cells. *Cancer Sci.* 2006; 97: 1198-1204.
4. Yoshioka S, Okawa C, Takahashi S, Katayama K, Tsukahara S, Mitsuhashi J, and Sugimoto Y. The identification of two germ-line mutations in the human breast cancer resistance protein gene that result in the expression of a low/non-functional protein. *Pharm. Res.* in press.
5. Katayama K, Masuyama K, Yoshioka S, Hasegawa H, Mitsuhashi J, and Sugimoto Y. Flavonoids inhibit breast cancer resistance protein-mediated drug resistance: transporter specificity and structure-activity relationship. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 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