

図2. CEC値の推移

2. CEC値と化学療法の効果との関連解析

CP療法群において、PR、SD群はPD群に比べて基礎値（化学療法施行前値）が高値であったが、CG療法群では、PR、SD、PD群の基礎値に有意差は認められなかった。PFSは、CP療法群では400以上の群で、有意に延長していたが、CG療法群では逆に、400以上の群ではPFSは有意に短かった（図3）。

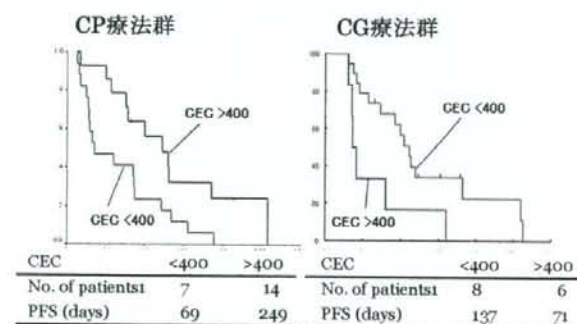


図3. 各治療群におけるCEC値とPFS

3. 他の血管因子と治療効果との関連解析

KDR阻害剤などは、血管密度以外に血管の構造の違いによりその効果に違いがある（より未熟な血管（pericyteが少ない）に効果が高い）という報告がある。Xenograft modelにおいて形成する血管と、その細胞株が分泌する血管関連因子との関連解析から、IL-8の分泌が多い細胞株において、より未熟な血管を形成する傾向を認めたため、IL-8をはじめとして、VEGF、Angiopietin-2などの因子を、ELISA法を用いて検討した。いずれの因子も治療効果と有意なものはなく、またCEC値と相関するものも見出せなかった。VEGF高値群はいずれの治療レジメンにおいてもPFSが有意に短く、従来の報告どおり予後不良因子であると考えられた。

D. 考察

我々の検討において、CP療法とCG療法では、CEC

の基礎値と治療効果（奏効率およびPFS）との関連、CECの治療後の変動は、ともに明確に相違した。Paclitaxelは、強力な血管内皮障害作用を持ち、これらの相違は、PaclitaxelとGemcitabineとの作用機序による可能性が考えられた。進行期非小細胞肺癌において、CP療法とCG療法が同等の効果を持つことが大規模臨床試験で確認されているが、現時点では治療の選択を決定する有用な指標はない。以上より、CECが治療レジメンを選択するバイオマーカーになりうる可能性が考えられた。

E. 結論

進行期非小細胞癌患者におけるCEC値は、効果予測マーカーと考えられ、CP療法、CG療法の差別化に有用な可能性が示唆された。今後さらにpaclitaxel, docetaxelによる単剤での検証、動物モデルによる検証をおこない、大規模試験の計画、KDR阻害剤、VEGF抗体におけるCECの役割を明確にしていきたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Matsumoto, K., Shimizu, C., Arai, T., Andoh, M., Katsumata, N., Kohno, T., Yonemori, K., Koizumi, F., Yokote, H., Aogi, K., Tamura, K., Nishio, K., Fujiwara, Y. Identification of Predictive Biomarkers for Response to Trastuzumab Using Plasma FUCA Activity and N-Glycan Identified by MALDI-TOF-MS. *J Proteome Res.*, 8(2): 457-462, 2009.
- Kawaishi, M., Fujiwara, Y., Fukui, T., Kato, T., Yamada, K., Ohe, Y., Kunitoh, H., Sekine, I., Yamamoto, N., Nokihara, H., Watabe, T., Shimoda, Y., Arai, T., Nishio, K., Tamura, T., Koizumi, F. Circulating endothelial cells in non-small cell lung cancer patients treated with carboplatin and paclitaxel. *J Thorac Oncol.*, 4(2): 208-213, 2009.
- Katanasaka, Y., Ida, T., Asai, T., Shimizu, K., Koizumi, F., Maeda, N., Baba, K., Oku, N. Antiangiogenic cancer therapy using tumor vasculature-targeted liposomes encapsulating 3-(3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-ylmethylene)-1,3-dihydro-indol-2-one, SU5416. *Cancer Lett.*, 270(2):260-268, 2008.
- Yamada, Y., Arai, T., Gotoda, T., Taniguchi, H., Oda, I., Shirao, K., Shimada, Y., Hamaguchi, T., Kato, K., Hamano, T., Koizumi, F., Tamura, T., Saito, D., Shimoda, T., Saka,

- M., Fukagawa, T., Katai, H., Sano, T., Sasako, M., Nishio, K. Identification of prognostic biomarkers in gastric cancer using endoscopic biopsy samples. *Cancer Sci.*, 99(11): 2193-2199, 2008.
- 5) Fukai, J., Nishio, K., Itakura, T., Koizumi, F. Antitumor activity of cetuximab against malignant glioma cells overexpressing EGFR deletion mutant variant III. *Cancer Sci.* 99(10):2062-2069, 2008.
- 6) Sumitomo M., Koizumi, F., Asano T., Horiguchi A., Ito K., Asano T., Kakizoe T., Hayakawa M., Matsumura Y. Novel SN-38-incorporated polymeric micelle, NK012, strongly suppresses renal cancer progression. *Cancer Res.* 68(6): 1631-1635, 2008.
- 7) Nakajima, TE., Yasunaga, M., Kano, Y., Koizumi, F., Kato, K., Hamaguchi, T., Yamada, Y., Shirao, K., Shimada, Y., Matsumura, Y. Synergistic antitumor activity of the novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil. *Int J Cancer*, 122(9): 2148-2153, 2008.
2. 学会発表
- 1) Tamura, K., Shimizu, C., Koizumi, F., Katsumata, N., Ando, M., Kouno, T., Yonemori, K., Kinoshita, T., Aogi, K., Fujiwara, Y. IgG fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab in patients with HER2 positive breast cancer. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 28-30, 2008. Nagoya Congress Center, Nagoya.
- 2) Goto, Y., Yamada, K., Yamamoto, N., Yamada, Y., Fujiwara, Y., Nokihara, H., Hirata, T., Koizumi, F., Nishio, K., Koyama, N., Tamura, T. Phase I Dose Escalation Study and Biomarker Analysis of E7080 in Patients with Advanced Solid Tumors. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 28-30, 2008. Nagoya Congress Center, Nagoya.
- 3) Matsumoto, K., Arao, T., Maegawa, M., Tanaka, K., Kaneda, H., Kudo, K., Fujita, Y., Koizumi, F., Shimizu, C., Tamura, K., Fujiwara, Y., Nishio, K. Identification of predictive biomarkers for response to Trastuzumab using glyco-biological analysis. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 28-30, 2008. Nagoya Congress Center, Nagoya.
- 4) Kosaka, N., Yamamoto, Y., Miyajima, A., Koizumi, F., Mizutani, T., Kanai, Y., Ochiya, T. Identification of a novel liver cancer biomarker candidate, miR-500, designated as an oncofetal microRNA. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 28-30, 2008. Nagoya Congress Center, Nagoya.
- 5) Kanda, S., Yamada, K., Fujiwara, Y., Nokihara, H., Yamamoto, N., Sekine, I., Kunitoh, H., Ohe, Y., Watabe, T., Shimoda, Y., Tamura, T., Koizumi, F. Circulating endothelial cells in non-small cell lung cancer patients treated with carboplatin and paclitaxel. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 28-30, 2008. Nagoya Congress Center, Nagoya.
- 6) Katanasaka, Y., Maeda, N., Koizumi, F., Oku, N. Cancer antineovascular therapy through targeting BiP using liposome drug delivery systems. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 28-30, 2008. Nagoya Congress Center, Nagoya.
- 7) Yamada, K., Yamamoto, N., Yamada, Y., Fujiwara, Y., Nokihara, H., Hirata, T., Koizumi, F., Nishio, K., Koyama, N., Tamura, T. Phase I dose escalation study and biomarker analysis of E7080 in patients with advanced solid tumors. American Society of Clinical Oncology Annual Meeting. 2008. May 30-June 3. Chicago, Illinois.
- 8) Fukui, T., Kodaera, Y., Taguchi, F., Kato, T., Watanabe, T., Masuda, N., Nishio, K., Koizumi, F. Synergistic interactions between the synthetic retinoid Tamibarotene (TM411) and Corticosteroids in human myeloma cells. American Association for Cancer Research 99th Annual Meeting. 2008. April 12-16. San Diego, CA.
- 9) Fukai, J., Owai, Y., Okita, R., Tanaka, Y., Uematsu, Y., Kodaera, Y., Fukui, T., Liu, J., Kawaishi, M., Kato, T., Taguchi, F., Koizumi, F., Itakura, T. Zoledronic acid enhances anti-tumor activity of temozolomide against human malignant glioma cell lines expressing O6-methylguanine DNA methyltransferase. American Association for Cancer Research 99th Annual Meeting. 2008. April 12-16. San Diego, CA.
- H. 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

分子標的薬を含む薬物治療最適化の基盤研究

研究分担者 桑野 信彦 九州大学 先端融合医療レドックスナビ研究拠点・特任教授

研究要旨：Y-ボックス結合タンパク-1 (YB-1) の核内局在は抗がん剤耐性の獲得に関与するだけでなくEGFR, HER2/erbB2やER α の発現と密接に関連していることが乳癌、肺癌や卵巣癌で見出された。さらにがんの血管新生やリンパ管新生に関与する腫瘍関連マクロファージの浸潤を制御するバイオマーカーとしてNDRG1/Cap43の働きを明らかにしつつある。

A. 研究目的

がん薬物療法の最適化およびがん悪性進展へ関与する間質応答の制御から新しい治療研究を進める。そのため、

- (1) がん治療の感受性を担うバイオマーカーとしてYB-1ならびにチュブリン関連タンパクについて検討する。
- (2) がん間質を制御することが期待されるNDRG1/Cap43と腫瘍関連マクロファージに注目して検討する。

B. 研究方法

がん薬物治療の最適化と新しい治療のためのバイオマーカーの探索を進めている。

- (1) 培養系の乳癌、肺癌、卵巣癌や胃癌細胞を対象にして薬剤感受性や間質を変化させるYB-1、NDRG1/Cap43、チュブリン関連タンパク質などの発現をmRNAやタンパクレベルで、その局在は共焦点レーザー顕微鏡で検討した。さらに発現の上昇や低下細胞株はcDNAやsiRNAの発現ベクターを用いて発現安定株を各々単離して解析した。
- (2) がん患者由来の外科切除標本を対象にした免疫組織染色法は各分子の抗体を用いて行なった。発現レベルのスコアは3人の病理学者が独立に行い、バイオ統計学については統計学の専門家が独立に行なった。またがん部位でのEGFRなどのmRNA発現や突然変異の有無についてはマイクロダイセクション法と塩期配列法で行なった。
- (3) 血管新生、リンパ管新生や腫瘍増大と抗腫瘍また抗血管新生効果についてマウスの角膜法や背部皮下法を、ヒトがんの移植ゼノクラフト系はヌードマウスを各々用いて行った。

(倫理面への配慮) 九州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) 培養系の乳癌や卵巣癌細胞でYB-1のノックダウンにより増殖が著明に抑制され、EGFR, c-MET, CXCR4やER α などの発現が低下した。そこで乳癌および卵巣癌由来の病理材料を対象にした免疫細胞学的解析を行った結果、YB-1の核内局在が、HER2やER α の発現(乳癌)と、MDR1/ABCB1, MVP/LRPやCXCR4の発現(卵巣癌)と有意に関連することが観察された。
- (2) タキサン系抗がん剤による治療の最適化に関与するマーカーを探索する目的で、がん化学療法に抵抗性を示す卵巣癌94症例を対象に仕事を行った。培養系卵巣癌細胞でのタキサン系抗がん剤感受性は β -チュブリンIIIやIVで変化した。患者由来の病理材料を対象に β -チュブリン、MAP4、スタスミンなどの発現レベルを免疫組織学的に検討したところ、 β -チュブリンIIIの発現が非タキサン系抗がん剤治療に比べ、タキサン系抗がん剤治療の治療感受性と有意に関連することが観察された。
- (3) NDRG1/Cap43は肺癌では血管新生や腫瘍増大に抑制的に働くが、子宮頸癌では逆にNDRG1/Cap43の発現レベルの上昇は血管新生や悪性度と正の相関を示した。NDRG1/Cap43のがん抑制効果はヒトのがん種によって異なることが示唆された。その理由については現在検討している。
- (4) がん間質に浸潤してくる腫瘍関連マクロファージ(TAM)はがんの増大や浸潤また血管新生を促進することが注目されている。TAMなどの活性化マクロファージを標的としたリポソーム化クロドロネートを投与したところ、リンパ管新生や肺癌細胞の骨転移を著明に抑制することが観察された。

D. 考察

がんの最適化マーカーとして、卵巣癌において、 β -チュブリンIIIがタキソール系治療の感受性マーカーに

なりうる可能性を示した。他方、YB-1の発現や核内局在はがんの多剤耐性の獲得に関する重要なだけでなく、EGFRファミリー遺伝子の発現に関与していることを明らかにしてきた。今後、YB-1標的治療研究が耐性とがん増殖の克服へ向けて努力していきたい。

がんの間質標的薬剤が、がん血管新生増大や骨転移などに効果的であった。マクロファージのがん間質への浸潤と活性化の機序を明らかにするとともに、TAM特異的なバイオマーカーを標的とした最適化治療薬研究をすすめていきたい。

E. 結論

- (1) YB-1の核内局在は多剤耐性関連ABCトランスポーターやMVP/LRPの発現だけでなくEGFRやHER2/erbB2の発現にも深く関与していた。さらに、卵巣癌においてβ-チューブリンIIIの発現がタキサン系抗がん剤治療の効果に重要であった。
- (2) 腫瘍関連マクロファージを標的とする薬剤の投与により血管新生やリンパ管新生だけでなく骨転移を著明に抑制した。さらにがんのマクロファージの浸潤にNDRG1/Cap43が影響することが見出された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hosoi, F., Izumi, H., Kawahara, A., Yuichi, M., Kinoshita, H., Kage, M., Nishio, K., Kohno, K., Kuwano, M., and Ono, M. N-myc downstream regulated gene 1/Cap43 suppresses tumor growth and angiogenesis of pancreatic cancer through attenuation of IKKβ expression. *Cancer Res.*, *in press*.
- 2) Aoki, D., Oda, Y., Hattori, S., Taguchi, K., Ohishi, Y., Basaki, Y., Oie, S., Suzuki, N., Kono, S., Tsuneyoshi, M., Ono, M., Kuwano, M. Overexpression of class III beta-tubulin predicts good response to taxane-based chemotherapy in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 15(4): 1473-80, 2009.
- 3) Fujii, T., Kawahara, A., Basaki, Y., Hattori, S., Nakashima, K., Nakano, K., Shirouzu, K., Kohno, K., Yanagawa, T., Yamana, H., Nishio, K., Ono, M., Kuwano, M., and Kage, M. Expression of HER2 and estrogen receptor alpha depends upon nuclear localization of Y-box binding protein-1 in human breast cancers. *Cancer Res.*, 68: 1504-1512, 2008.
- 4) Koga, M., Kai, H., Egami, K., Murohara, T., Ikeda, A., Yasuoka, S., Egashira, K., Matsuishi, T., Kai, M., Kataoka, Y., Kuwano, M., and Imaizumi, T. Mutant MCP-1 therapy inhibits tumor angiogenesis and growth of malignant melanoma in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 365: 279-284, 2008.
- 5) Nishio, S., Tsuda, N., Takemoto, S., Kawano, K., Ushijima, K., Yamaguchi, T., Nishida, N., Kakuma, T., Tsuda, H., Kasamatsu, T., Sasajima, Y., Kage, M., Kuwano, M., and Kamura, T. Cap43/NDRG1/Drp-1 is a molecular target for angiogenesis and a prognostic indicator in cervical adenocarcinoma. *Cancer Lett.*, 264: 36-43, 2008.
- 6) Shiota, M., Izumi, H., Miyamoto, N., Onitsuka, T., Kashiwagi, E., Kidani, A., Hirano, G., Ono, M., Kuwano, M., Naito, S., Sasaguri, Y., and Kohno, K. Ets Transcription factors regulate peroxiredoxin1 and peroxiredoxin5 expression through their interaction with the high mobility group protein HMGB1. *Cancer Sci.*, 99: 1950-1959, 2008.
- 7) Fujii, T., Yokoyama, G., Takahashi, H., Namoto, R., Nakagawa, S., Toh, U., Kage, M., Shirouzu, K., and Kuwano, M. Preclinical studies of molecular-targeting diagnostic and therapeutic strategies against breast cancer. *Breast Cancer*, 15: 73-78, 2008.
- 8) Fujii, T., Yokoyama, G., Takahashi, H., Toh, U., Kage, M., Ono, M., Shirouzu, K., and Kuwano, M. Preclinical and clinical studies of novel breast cancer drugs targeting molecules involved in protein kinase C signaling, the putative metastasis-suppressor gene Cap43 and the Y-box binding protein-1. *Current Medicinal Chem.*, 15: 528-537, 2008.
- 9) Oda, Y., Kohashi, K., Yamamoto, H., Tamiya, S., Kohno, K., Kuwano, M., Iwamoto, Y., Tajiri, T., Taguchi, T., and Tsuneyoshi, M. Different expression profiles of Y-box-binding protein-1 and multidrug resistance-associated proteins between alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Sci.*, 99: 726-732, 2008.
- 10) Hiraoka, K., Zenmyo, M., Watari, K., Iguchi, H., Fotovati, A., Kimura, Y., Hosoi, F., Shoda, T., Nagata, K., Osada, H., Ono, M., and Kuwano, M. Inhibition of bone and muscle metastases of

lung cancer cells by decrease in the number of monocytes/macrophages. *Cancer Sci.*, 99: 1595-1602, 2008.

- 11) Zhao, H., Ooyama, A., Yamamoto, M., Ikeda, R., Haraguchi, M., Tabata, S., Furukawa, T., Che, X., Iwashita, K., Oka, T., Fukushima, M., Nakagawa, M., Ono, M., Kuwano, M., and Akiyama, S. Down regulation of c-Myc and induction of an angiogenesis inhibitor, thrombospondin-1, by 5-FU in human colon cancer KM12C cells. *Cancer Lett.*, 270 : 156-163, 2008.
- 12) Zhao, H., Ooyama, A., Yamamoto, M., Ikeda, R., Haraguchi, M., Tabata, S., Furukawa, T., Che, X., Zhang, S., Oka, T., Fukushima, M., Nakagawa, M., Ono, M., Kuwano, M., and Akiyama S. Molecular basis for the induction of an angiogenesis inhibitor, thrombospondin-1, by 5-fluorouracil. *Cancer Res.*, 68: 7035-7041, 2008.
- 13) Moriya, F., Ogasawara, S., Basaki, Y., Akiba, J., Kojiro, S., Fukahori, S., Ishizaki, H., Nishida, N., Matsuoka, K., Kojiro, M., Kuwano, M., and Yano, H. Growth inhibitory effects of pegylated IFN-alpha2b and 5-fluorouracil in combination on renal cell carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Int J Oncol.*, 33: 647-655, 2008.
- 14) Watari, K., Nakao, S., Fotovati, A., Basaki, Y., Hosoi, F., Bereczky, B., Higuchi, R., Miyamoto, T., Kuwano, M., and Ono, M. Role of macrophages in inflammatory lymphangiogenesis: Enhanced production of vascular endothelial growth factor C and D through NF-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun.*, 377: 826-831, 2008.

2. 学会発表

1) 桑野信彦.

がんのバイオマーカーとしてのY-ボックス結合蛋白-1 (YB-1) の核内局在. 第12回分子標的がん治療研究会.

2008年6月26日 (東京)

2) 馬崎雄二、樫原正樹、西尾和人、和泉弘人、河野公俊、小野眞弓、桑野信彦.

乳がんにおけるYB-1によるHER2, ER α 及びCXCR-4の発現制御. 第67回日本癌学会学術総会

2008年10月28日 (名古屋)

3) 河原明彦、細井文仁、小野眞弓、桑野信彦、鹿毛政義.

高・中分化型胃癌における転移抑制遺伝子NDRG1/Cap43は、HER2, E-cadherin/ β -catenin発現と関連を示す. 第67回日本癌学会学術総会
2008年10月28日 (名古屋)

4) 細井文仁、和泉弘人、河原明彦、村上雄一、渡公佑、鹿毛政義、西尾和人、河野公俊、桑野信彦、小野眞弓.

NDRG1/Cap43のヒト膀胱癌における血管新生の制御. 第67回日本癌学会学術総会
2008年10月29日 (名古屋)

5) 東公一、高森信三、桑野信彦.

CBDCa+PTX投与を行なった術後再発非小細胞癌患者におけるERCC1, Class11 β -Tubulinの発現と予後. 第67回日本癌学会学術総会
2008年10月29日 (名古屋)

6) 渡公佑、細井文仁、村上雄一、馬崎雄二、宮本智文、桑野信彦、小野眞弓.

がんの血管新生とリンパ管新生におけるNF-kBシグナルの役割. 第67回日本癌学会学術総会
2008年10月29日 (名古屋)

H. 知的財産等の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

YB-1核内局在とEGFレセプターの発現 (申請中)

2. 実用新案登録

なし

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

研究分担者 掛谷 秀昭 京都大学大学院薬学研究科・教授

研究要旨

我々が血管新生抑制剤探索系において、糸状菌代謝産物より見出したユニークな1-oxa-7-azaspiro[4.4]non-2-ene-4,6-dione骨格構造を有する血管新生抑制剤アザスピレンが、Raf-MEK-ERK経路の活性化を抑制することを明らかにした。さらに、マウスXenograft modelにおいても腫瘍血管新生を抑制することを明らかにし、アザスピレンの化学構造が、新規血管新生抑制剤開発のための新規ファーマコホアになりうる可能性を示した。

A. 研究目的

血管新生・細胞周期・アポトーシス等を制御する新規生理活性物質を微生物代謝産物（天然物ライブラリー）および合成化合物ライブラリーより見出し、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研究）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. 我々がヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVECs)の遊走阻害に関する表現型スクリーニングにより見出した血管新生抑制剤アザスピレン（糸状菌代謝産物）のHUVECsにおける管腔形成への影響、およびVEGFが誘導するVEGFR2, Raf-1, MEK1/2, ERK1/2の活性化に与える影響を免疫沈降法、およびWestern blotting法を用いて検討した。さらに、HUVECsにおいて、EGF, FGF, およびPDGFによって活性化されるRaf-MEK-ERK経路に与えるアザスピレンの効果を検討した。
2. ニワトリ受精卵胚漿膜法(Chick Chorionallantoic membranes assay: CAM assay)における血管新生に対するアザスピレンの効果を検討した。
3. アザスピレンの細胞内標的分子を検討するための分子プローブの創製に向けて、アザスピレン誘導体の合成検討を行った。
4. ヒト腎癌Renca細胞をマウス背部皮内へ移植したin vivo実験系を用いて、アザスピレンの血管新生抑制効果および抗腫瘍効果を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究に使用した各種培養細胞株は一般に普及した細胞であり、資料提供者の人権・利権等については問題ない。

C. 研究結果

1. アザスピレンは、3次元培養系におけるHUVECsの

管腔形成を濃度依存的に抑制した。また、アザスピレンは、濃度依存的に、VEGFが誘導するRaf-1, MEK1/2, ERK1/2の活性化を抑制した。一方で、アザスピレンは、VEGFR2の活性化には影響を与えなかった。さらに、アザスピレンは、HUVECsにおいて、EGF, FGF, およびPDGFによるRaf-MEK-ERK経路の活性化も濃度依存的に抑制した。

2. アザスピレンは、CAM assayにおいて濃度依存的に血管新生抑制効果を示した。
3. アザスピレンの各種誘導体合成のために、酸化的条件、還元的条件をはじめとして、安定性等の検討を行い複数の誘導体の合成を行った。
4. ヒト腎癌Renca細胞をマウス背部皮内へ移植したマウスXenograft モデル実験系において、アザスピレンは31.6-100 mg/kg(i.p.)の濃度域で、有意に血管新生抑制効果を示した。

D. 考察

アザスピレンは、HUVECsにおいて、VEGF受容体の活性化には影響を与えることなく、VEGF, EGF, FGF, およびPDGFが活性化するRaf-MEK-ERK経路を抑制することで、血管新生抑制効果を示すことが示唆された。アザスピレンのin vivo実験系における有効濃度はやや高く、アザスピレンの各種化学反応条件下での安定性等を基盤として、今後、さらなる活性の向上、溶解性の向上のための検討が重要である。

E. 結論

血管新生抑制剤アザスピレンは、血管内皮細胞において、VEGF, EGF, FGF, およびPDGFなどによって活性化されるRaf-MEK-ERK経路を抑制することで、血管新生抑制効果を示すことが示唆された。また、アザスピレンの化学構造は、これまでに報告されている血管新生抑制剤とは化学構造が大きく異なるため、抗がん剤開発のための新規ファーマコホアになりうる可能性が期待される。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

- 1) Asami, Y., Takeya, H., Komi, Y., Kojima, S., Beebe, K., Neckers, L., Nishikawa, K., Osada, H. Azaspirene, a fungal product, inhibits angiogenesis by blocking Raf-1 activation. *Cancer Sci.*, 99, 1853-1858, 2008.
- 2) Kamiyama, H., Usui, T., Sakurai, H., Shoji, M., Hayashi, Y., Takeya, H., Osada, H. Epoxyquinol B, a naturally occurring pentaketide dimer, inhibits NF-kappaB signaling by crosslinking TAK1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 1894-1900, 2008.
- 3) Hayashi, Y., Shoji, M., Ishikawa, H., Yamaguchi, J., Tamura, T., Imai, H., Nishigaya, Y., Takabe, K., Takeya, H., Osada, H. The asymmetric total synthesis of (+)-cytotrienin A, an ansamycin-type anticancer drug. *Angew Chem Int Ed Engl.* 47(35): 6657-6660, 2008.
- 4) Jain, H.D., Zhang, C., Zhou, S., Zhou, H., Ma, J., Liu, X., Deveau, A.M., Dieckhaus, C.M., Johnson, M.A., Smith, K.S., Macdonald, T.L., Takeya, H., Osada, H., Cook, J.M. Synthesis and structure-activity relationship studies on tryprostatin A, an inhibitor of breast cancer resistance protein. *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 4626-4651, 2008.
- 5) 西村慎一, 掛谷秀昭. 生体高分子の多面性理解に向けたケミカルジェネティクス:新規素材探索とその応用. 新規素材探索-医薬品リード化合物・食品素材を求めて. 上村大輔(監修). pp85-94, 2008.

H. 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。

トランスポーターの制御による分子標的治療法の開発と薬効評価に関する研究

研究分担者 杉本 芳一 慶應義塾大学薬学部教授

研究要旨

我々は、gefitinibが強いBCRP阻害作用を持つこと、およびgefitinib高感受性ヒト培養がん細胞A431、PC-9にBCRPを導入するとgefitinibに耐性となることを示してきた。しかしK562、KB、HCT-116などのgefitinib低感受性細胞ではBCRPの導入によるgefitinib耐性を示さなかった。この機構を解明するためにBCRPによるgefitinib輸送と、EGFR下流シグナルのgefitinibによる阻害について検討した。その結果、BCRP発現細胞ではgefitinibの細胞内濃度が低下するが、BCRPによるgefitinibのシグナル伝達阻害の回復はgefitinib高感受性細胞でのみ起き、これがgefitinib耐性の直接の原因であるということを示した。

我々は、BCRPがS-Sを介したhomodimerとして機能することを示した。今回、BCRPの細胞外領域のCysをSerに置換した変異体を作成して解析した結果、C592S・C603S・C608S triple mutantでは、BCRPのdimer形成がみられなかった。しかしこのtriple mutant発現細胞が抗がん剤耐性を示したことから、BCRPのポンプ機能にはcovalentなdimer形成を必要としないことが示された。また、BCRPのdimer形成にはCys-603とCys-608の2つが重要であることが示された。

A. 研究目的

本研究では、抗がん剤排出トランスポーターであるP-gpとBCRPを中心に、新規分子標的治療薬のトランスポーター特異性を明らかにし、がん細胞あるいは正常組織に発現するこれらのトランスポーターが抗がん剤および新規分子標的治療薬の効果と副作用に及ぼす影響について解析する。また、トランスポーターの活性阻害薬、発現抑制薬を探索・同定し、がん治療への応用に向けて開発を進める。

B. 研究方法

gefitinibに高感受性なヒト培養がん細胞であるA431とPC-9、およびgefitinibに低感受性ながん細胞K562、KB、HCT-116に、レトロウイルスを用いてBCRP遺伝子を導入し、BCRP発現細胞であるA431/BCRP、PC-9/BCRP、K562/BCRP、KB/BCRP、HCT-116/BCRPを樹立した。細胞のBCRP発現はFACSとwestern blotにより、薬剤感受性は細胞増殖阻害試験により検討した。各細胞へのgefitinibの取り込み及び排出実験において、細胞内gefitinibを抽出して逆相シリカゲルHPLCにより分離定量した。HPLCの移動層には1%酢酸アンモニウム：アセトニトリル=20：80を用いた。EGFR、ERK、Aktの発現とリン酸化は、それぞれの特異的抗体を用いたwestern blotにより検討した。

BCRPの膜外領域に存在するCys-592、Cys-603、Cys-608のうち1つ、3つ、または3つ全てをSerに置換したmutant BCRPのcDNAを作成し、マウス繊維芽細胞PA317に導入して、mutant BCRP発現細胞（PA/C592S、PA/C6

03S、PA/C608S、PA/C592S-C603S、PA/C592S-C608S、PA/C603S-C608S-mix、PA/C592S-C603S-C608Sを得た。これらの細胞のmixed populationおよびcloneにおけるBCRPのdimer形成と抗がん剤感受性を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究における遺伝子組換え実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」とその関係法令、慶應義塾大学薬学部の遺伝子組換え実験安全要綱等に従って行った。

C. 研究結果

BCRP発現細胞A431/BCRP、PC-9/BCRPはgefitinibに8～10倍の耐性を獲得した。しかしK562/BCRP、KB/BCRP、HCT-116/BCRPはgefitinibに耐性を示さなかった。A431/BCRP、PC-9/BCRP、KB/BCRP、HCT-116/BCRPの4種のBCRP遺伝子導入細胞を用いてgefitinibの取り込みと排出を調べたところ、いずれのBCRP遺伝子導入細胞でも、それぞれの親株に比べてgefitinibの取り込みの低下と排出の促進が認められた。これにより、BCRPがgefitinibを直接輸送することが初めて確認された。さらにgefitinibによるEGFRの下流のシグナル伝達について検討したところ、EGFR、ERK、Aktのそれぞれのシグナル分子のリン酸化のgefitinibによる阻害は、A431/BCRP、PC-9/BCRPではそれぞれの親株に比べて低濃度で起こった。しかし、KB/BCRP、HCT-116/BCRPでは、gefitinibによるEGFR下流シグナルの阻害がほとんど起こらず、またそれぞれの親株との間で差は見られなかった。以上より、BCRP発現細胞ではgefitinibの細胞

内濃度が低下するが、BCRPによるgefitinibのシグナル伝達阻害の回復はgefitinib高感受性細胞でのみ起こることが示された。

BCRPの細胞外領域のCys-592、Cys-603、Cys-608をSerに置換したsingle、double、triple mutantを作成して解析した。その結果、C592S・C603S・C608S triple mutantではdimer形成がみられなかった。よって、dimer形成に関与するCysは膜外の3つに限定された。C592S・C603S・C608S triple mutantの高発現株が抗がん剤耐性を示したことから、BCRPのポンプ機能には、covalentなdimer形成を必要としないことが示された。また、C592S・C603Sでは安定なdimer形成が起こったが、C603S・C608Sではdimerが形成されなかったことから、Cys-603に加えて、Cys-608もBCRPのdimer形成に関与すると推論した。

D. 考察

P-gp、BCRPなどのABC輸送体は種々の抗がん剤を細胞外に排出するポンプとして機能し、がん細胞の抗がん剤感受性を規定する重要な因子となる。一方、これらの抗がん剤排出トランスポーターは正常の肝臓、腎臓、消化管などに発現し、種々の生理活性物質・薬物・毒物を体外に排出する働きを担っている。このため、正常組織におけるトランスポーター活性の低下は、抗がん剤の排出の阻害による血中濃度の増大を引き起こすと考えられる。

多くのABC輸送体は、分子内2量体様構造をとるか、あるいはヘテロ2量体として機能する。どちらの場合でも、2量体分子は同一ではない。BCRPは、Cysを介した共有結合によりホモ2量体として機能するという特徴を持つ。今回の研究で、BCRPの2量体間の共有結合が、BCRPの機能に必須ではないことが示された。しかしtriple mutantを含む多くのCys→Ser変異BCRPの細胞における発現が低かったことから、BCRPの2量体形成はBCRPの安定な発現のために重要であると考えられた。

E. 結論

gefitinib高感受性ヒト培養がん細胞A431、PC-9にBCRPを導入すると、gefitinibに耐性となる。この機序は、BCRP発現細胞におけるgefitinibの細胞内濃度の低下と、BCRP発現細胞におけるgefitinibによるEGFRのシグナル伝達阻害の低下によるものであり、特に後者がgefitinib高感受性細胞に特異的に起こるということを明らかにした。

BCRPの細胞外領域の3つのCysを全てSerに置換したC592S・C603S・C608S triple mutantでは、BCRPのdimer形成がみられなかった。しかしこのtriple mutant発現細胞が抗がん剤耐性を示したことから、BCRPのポン

プ機能にはcovalentなdimer形成を必要としないことが示された。また、BCRPのdimer形成にはCys-603とCys-608の2つが重要であることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mashima, T., Sato, S., Sugimoto, Y., Tsuruo, T., Seimiya, H. Promotion of glioma cell survival by acyl-CoA synthetase 5 under extracellular acidosis conditions. *Oncogene.*, 28(1): 9-19, 2009.
- 2) Noguchi, K., Katayama, K., Mitsuhashi, J., Sugimoto, Y. Functions of BCRP in cancer chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, in press.
- 3) Katayama, K., Shibata, K., Mitsuhashi, J., Noguchi, K., Sugimoto, Y. Pharmacological Interplay between breast cancer resistance protein and gefitinib in epidermal growth factor receptor signaling. *Anticancer Res*, 2009, in press.
- 4) Kato, N., Suzuki, H., Takagi, H., Asami, Y., Takeya, H., Uramoto, M., Usui, T., Takahashi, S., Sugimoto, Y., Osada, H. Identification of cytochrome P450s required for fumitremorgin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem*, 2009, in press.
- 5) Katayama, K., Nakamura, A., Sugimoto, Y., Tsuruo, T., Fujita, Y. FOXO transcription factor-dependent p15(INK4b) and p19(INK4d) expression. *Oncogene.*, 27(12): 1677-1686, 2008.

H. 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

生物学的特性に基づく癌分子標的治療法の開発と臨床導入に関する研究

研究分担者 中川 和彦 近畿大学医学部内科学腫瘍内科学部門 教授

研究要旨

抗EGFR抗体であるNimotuzumabと放射線治療との併用により、放射線感受性増強効果が生じる事を非小細胞肺癌細胞株を用いてin vitro及びin vivoのモデルにおいて示した。この細胞表面におけるEGFRの発現量はその併用増強効果と相関している可能性がある。

A. 研究目的

抗EGFR抗体であるNimotuzumabによるEGFRシグナル抑制効果及び放射線との相乗効果に関して非小細胞肺癌細胞株を用いて検討した。さらに、この相乗効果を規定する因子を探索する。

B. 研究方法

①5つの肺癌細胞株(H460, H1299, H1975, Ma-1, H292)に関して、EGFR遺伝子変異の状況をダイレクトシーケンス、EGFRの細胞表面での発現量をウエスタンブロット、フローサイトメトリーにて検討した。

②EGF刺激時のEGFRシグナル活性化に及ぼすNimotuzumabの影響を、EGFRのリン酸化を指標としてウエスタンブロットにて検討した。

③in vitroにおけるNimotuzumabと放射線との併用効果をColony formation assayを用いて検討しDose enhancement factorを算出。

④in vivoにおけるNimotuzumabと放射線との併用効果をマウスモデル(H460細胞, Ma-1細胞, H292細胞)を用いて検討。

C. 研究結果

①5つの肺癌細胞株(H460, H1299, H1975, Ma-1, H292)に関して、EGFR遺伝子変異の状況、EGFRの細胞表面での発現量に関して以下の結果を得た。

H460 (wt-EGFR); EGFR低発現
H1299 (wt-EGFR); EGFR低発現
H1975 (L858R/T790M); EGFR低発現
Ma-1 (delE746-A750); EGFR中等度発現
H292 (wt-type); EGFR高発現

②これら5つの細胞株において、EGF刺激時のEGFRシグナル活性化に及ぼすNimotuzumabの影響を検討したところ、EGFR中等度～高発現株であるH292, Ma-1においてはEGF刺激によるEGFRの自己リン酸化反応はNimotuzumabの処理による濃度依存性に抑制された。一方、EGFR低発現株である、H460, H1299, H1975においてはNimotuzumabによるEGFRのリン酸化抑制効果は認められなかった。このことはNimotuzumabによるEGFRシグナル

抑制効果は細胞表面のEGFR発現量に依存することが示唆された。

③Colony formation assayを用いたin vitroでの放射線とNimotuzumab併用による相互作用検討においては、EGFR中等度～高発現株であるH292, Ma-1において放射線単独群に比べてNimotuzumab併用群で優位にsurvival rateの低下を示し放射線感受性増強効果が示された。一方この相乗効果は、NimotuzumabによるEGFRシグナルの抑制効果を認めなかったEGFR低発現株である、H460, H1299, H1975においては認められなかった。

④本研究で認められたin vitroにおけるNimotuzumabと放射線治療との相乗効果をin vivoの系にて検証すべくマウスモデル(H460細胞, Ma-1細胞, H292細胞)を用いた実験を行った。in vitroにおける結果と同様に、EGFR中等度～高発現株であるH292, Ma-1においてNimotuzumabと放射線治療の併用により、放射線治療単独、Nimotuzumab単独治療に比べ有意の腫瘍増殖の抑制効果を認め、EGFR低発現株であるH460細胞においては併用による抗腫瘍効果の増強は認められなかった。

D. 考察

抗EGFR抗体であるNimotuzumabによるEGFRシグナル抑制効果及び放射線との相乗効果に関して非小細胞肺癌細胞株を用いて検討した。同じEGFRを標的とする低分子EGFRチロシンキナーゼ阻害剤においてはEGFR遺伝子変異の有無と薬剤効果との有意な相関が知られているが、今回の検討においてはNimotuzumabによるEGFRシグナル抑制効果はEGFR遺伝子変異の有無とは相関がなく、細胞表面のEGFRの発現量との相関を認めた。また放射線治療との相乗効果に関してもNimotuzumabによるEGFRシグナル抑制効果を認めるEGFR中等度～高発現株においてのみ認められ、EGFRシグナル抑制が放射線感受性増強に寄与していることが示唆された。

E. 結論

抗EGFR抗体であるNimotuzumabの非小細胞肺癌細胞株における放射線感受性増強効果がin vitro, in vivoで示された。細胞表面におけるEGFRの発現量はその併

用増強効果と相関している可能性があり、今後の臨床試験におけるEGFR発現量の評価をどのように行っていくかも課題と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeda, K., Negoro, S., Tamura, T., Nishiwaki, Y., Kudoh, S., Yokota, S., Matsui, K., Semba, H., Nakagawa, K., Takada, Y., Ando, M., Shibata, T., Saijo, N. Phase III trial of docetaxel plus gemcitabine versus docetaxel in second-line treatment for non-small-cell lung cancer: results of a Japan Clinical Oncology Group trial (JCOG0104). *Ann Oncol.*, 2009. in press.
- 2) Tanaka, K., Arao, T., Maegawa, M., Matsumoto, K., Kaneda, H., Kudo, K., Fujita, Y., Yokote, H., Yanagihara, K., Yamada, Y., Okamoto, I., Nakagawa, K., Nishio, K. SRPX2 is overexpressed in gastric cancer and promotes cellular migration and adhesion. *Int J Cancer*, 124: 1072-1080, 2009.
- 3) Nakagawa, K., Minami, H., Kanazaki, M., Mukaiyama, A., Minamide, Y., Uejima, H., Kurata, T., Nogami, T., Kawada, K., Mukai, H., Sasaki, Y., Fukuoka, M. Phase I Dose-escalation and Pharmacokinetic Trial of Lapatinib (GW572016), a Selective Oral Dual Inhibitor of ErbB-1 and -2 Tyrosine Kinases, in Japanese Patients with Solid Tumors. *Jpn J Clin Oncol*, 39(2): 116-123, 2009.
- 4) Kudoh, S., Kato, H., Nishiwaki, Y., Fukuoka, M., Nakata, K., Ichinose, Y., Tsuboi, M., Yokota, S., Nakagawa, K., Suga, M. Japan Thoracic Radiology Group, Jiang H, Itoh Y, Armour A, Watkins C, Higenbottam T, Nyberg F. Interstitial lung disease in Japanese patients with lung cancer: a cohort and nested case-control study. *Am J Respir Crit Care Med*, 177(12): 1348-1357, 2008.
- 5) Kiura, K., Nakagawa, K., Shinkai, T., Eguchi, K., Ohe, Y., Yamamoto, N., Tsuboi, M., Yokota, S., Seto, T., Jiang, H., Nishio, K., Saijo, N., Fukuoka, M. A randomized, double-blind, phase IIa dose-finding study of Vandetanib (ZD6474) in Japanese patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 3(4): 386-93, 2008.
- 6) Koivunen, JP., Kim, J., Lee, J., Rogers, AM., Park, JO., Zhao, X., Naoki, K., Okamoto, I., Nakagawa, K., Yeap, BY., Meyerson, M., Wong, K-K., Richards, WG., Sugarbaker, DJ., Johnson, BE., Janne PA. Mutations in the LKB1 tumour suppressor are frequently detected in tumours from Caucasian but not Asian lung cancer patients. *Br J Cancer*, 99(2): 245-52, 2008.
- 7) Ohe, Y., Ichinose, Y., Nakagawa, K., Tamura, T., Kubota, K., Yamamoto, N., Adachi, S., Nambu, Y., Fujimoto, T., Nishiwaki, Y., Saijo, N., Fukuoka, M. Efficacy and safety of two doses of pemetrexed supplemented with folic acid and vitamin B12 in previously treated patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 14(13): 4206-4212, 2008.
- 8) Maruyama, R., Nishiwaki, Y., Tamura, T., Yamamoto, N., Tsuboi, M., Nakagawa, K., Shinkai, T., Negoro, S., Imamura, F., Eguchi, K., Takeda, K., Inoue, A., Tomii, K., Harada, M., Masuda, N., Jiang, H., Itoh, Y., Ichinose, Y., Saijo, N., Fukuoka, M. Phase III study, V-15-32, of gefitinib versus docetaxel in previously treated Japanese patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.*, 26(26): 4233-5, 2008.
- 9) Okamoto, I., Nishimura, T., Miyazaki, M., Yoshioka, H., Kubo, A., Takeda, K., Ebi, N., Sugawara, S., Katakami, N., Fukuoka, M., Nakagawa, K. Phase II study of combination therapy with S-1 and irinotecan for advanced non-small cell lung cancer: west Japan thoracic oncology group 3505. *Clin Cancer Res.*, 14(16): 5250-5254, 2008.
- 10) Iwasa, T., Okamoto, I., Suzuki, M., Nakahara, T., Yamanaka, K., Hatashita, E., Yamada, Y., Fukuoka, M., Ono, K., Nakagawa, K. Radiosensitizing effect of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res.*, 14(20): 6496-504, 2008.
- 11) Takezawa, K., Okamoto, I., Fukuoka, M., Nakagawa, K. Pharmacokinetic analysis of carboplatin and etoposide in a small cell lung cancer patient undergoing hemodialysis. *J Thorac Oncol.*, 3(9):1073-5, 2008.
- 12) Yoshida, T., Okamoto, I., Iwasa, T., Fukuoka, M., Nakagawa, K. The anti-EGFR monoclonal antibody blocks cisplatin-induced activation of EGFR signaling mediated by HB-EGF. *FEBS Lett*, 582(30): 4125-4130, 2008.
- 13) Kubota, K., Nishiwaki, Y., Tamura, T.

Nakagawa, K., Matsui, K., Watanabe, K., Hida, T., Kawahara, M., Katakami, N., Takeda, K., Yokoyama, A., Noda, K., Fukuoka, M., Saijo, N. Efficacy and safety of erlotinib monotherapy for Japanese patients with advanced non-small cell lung cancer: a phase II study. J Thorac Oncol, 3(12): 1439-1445. 2008.

- 14) Nakagawa, K., Yamazaki, K., Kunitoh, H., Hida, T., Gemba, K., Shinkai, T., Ichinose, Y., Adachi, S., Nambu, Y., Saijo, N., Fukuoka, M. Efficacy and safety of Pemetrexed in combination with cisplatin for malignant pleural mesothelioma : A Phase I/II study in Japanese patients. Jpn J Clin Oncol, 38(5): 339-346, 2008.

H. 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

乳癌の化学療法効果予測法の開発に関する研究

研究分担者 野口 眞三郎 大阪大学大学院医学系研究科乳腺内分泌外科教授

研究要旨

組織免疫染色でALDH1（乳がん幹細胞のマーカー）陽性の乳がんは、ER陰性、HER2陽性、Ki67陽性の形質を有する。また、ALDH1陽性の乳がんは化学療法に耐性であり、ALDH1は化学療法耐性のマーカーとして臨床上有用であることが示唆された。

A. 研究目的

近年、乳がんにもがん幹細胞が存在することが明らかにされた。乳がん幹細胞は、ABCG2等のトランスポーターを高発現し化学療法に耐性の形質を有することが細胞株を用いた実験で証明されている。本研究の目的は、ヒト乳がん組織におけるがん幹細胞を免疫組織学的に同定し、化学療法耐性ととの相関およびその臨床的意義を明らかにすることである。

B. 研究方法

(1) 203例の原発乳がん症例を対象として、乳がん組織におけるがん幹細胞を免疫組織染色法（ALDH1）で同定し、幹細胞陽性乳がんの臨床病理学的特徴を解析した。

(2) 術前化学療法（paclitaxel→FEC療法）を実施した108例の原発乳がん症例を対象として、化学療法実施前に採取した腫瘍組織を用いてALDH1免疫組織染色でがん幹細胞を同定した。次に、術前化学療法の効果を病理学的に判定し、がん細胞が完全消失した例（pCR）を有効例とし、ALDH1によるがん幹細胞同定の結果とpCRの相関を解析した。同時にER、PR、HER2、Ki67等のバイオマーカーについても化学療法の効果との相関を解析した。

（倫理面への配慮）

今回実施した研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針、および、臨床研究に関する倫理指針に基づき大阪大学医学倫理委員会で承認を受けたものである。

C. 研究結果

(1) ALDH1陽性（乳がん幹細胞陽性）乳がんは、統計学的に有意にER陽性率が低く、また逆に、HER2陽性率

は高値であった。更に、ALDH1陽性乳がんはKi67の発現が有意に高値であった。二重染色による細胞レベルでの解析では、ALDH1陽性のがん幹細胞は、ER陰性、HER2陽性、および、Ki67陰性の形質を示すことが明らかとなった。

(2) ALDH1陽性乳がんは陰性乳がんに比して有意にpCR率が低かった（9.5% vs 32.2%）。また、ER陰性乳がんは陽性乳がんよりもpCR率が高く（50.0% vs 15.7%）、Ki67高値の乳がんは低値の乳がんよりもpCRが高値であった（45.7% vs 14.5%）。種々の臨床病理学的因子を含めた多変量解析の結果、ALDH1、ER、Ki67の3因子がそれぞれ独立した化学療法の効果予測因子であることが判明した。

(3) 術前化学療法の前後で腫瘍組織におけるALDH1の発現を比較したところ、術前化学療法終了後にALDH1の発現が有意に増加することが明らかとなった。

(4) 27例の原発乳がん症例においては、腫瘍組織におけるALDH1の発現とコロニー形成能（colony formation assay）の相関について検討した。その結果、ALDH1陽性乳がんのコロニー形成能はALDH1陰性乳がんよりも有意に高値であった。

D. 考察

ALDH1は現時点では乳がん幹細胞の最も優れたマーカーであると考えられている。我々の検討でもALDH1陽性乳がんはコロニー形成能が高くがん幹細胞のマーカーとして有用であることが確認された。今回の検討の結果、腫瘍単位の解析では、ALDH1陽性乳がんは、ER陽性率が低く、HER2陽性率が高く、Ki67陽性率が高いことが明らかとなった。一方、二重染色による細胞レベルでの解析では、ALDH1陽性の乳がん幹細胞は、ER陰性、HER2陽性、Ki67陰性の形質を持つことが明らかとなった。ALDH1陽性乳がんでは、ALDH1陽性細胞（がん幹細胞）の増殖能自身は低いとそのprogenitor

cellsの増殖が高いため、腫瘍全体としてはKi67の発現が高値になるものと推察された。また、術前化学療法実施症例を対象とした検討より、ALDH1が化学療法耐性のマーカーとして有用であることが示唆された。化学療法後にALDH1の発現が上昇するという結果は、がん幹細胞が化学療法耐性の形質を有しているとするこれまでのin vitroの研究結果を裏付けるものである。

E. 結論

乳がん幹細胞の同定にはALDH1免疫染色が有用であり、本法で同定された乳がん幹細胞は、ER陰性、HER2陽性、Ki67陰性の形質を有する。乳がん幹細胞自身の増殖能は低いとそのprogenitor cellsの増殖能は高いと推察された。また、ALDH1は化学療法耐性のマーカーとして臨床上有用であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okishiro, M., Taguchi, T., Kim, S. J., Tanji, Y., Shimazu, K., Tamaki, Y., and Noguchi, S. Incidence of joint symptoms and bone fractures in Japanese postmenopausal breast cancer patients treated with adjuvant anastrozole. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 2009, *in press*.
 - 2) Shimomura, A., Miyoshi, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., and Noguchi, S. Association of loss of BRCA1 expression with centrosome aberration in human breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 135: 421-430, 2009.
 - 3) Naoi, Y., Miyoshi, Y., Taguchi, T., Kim, S. J., Arai, T., Maruyama, N., Tamaki, Y., and Noguchi, S. Connexin26 expression is associated with aggressive phenotype in human papillary and follicular thyroid cancers. *Cancer Lett.*, 262: 248-256, 2008.
 - 4) Akazawa, K., Tamaki, Y., Taguchi, T., Tanji, Y., Miyoshi, Y., Kim, S. J., Shimazu, K., Ueda, S., Yanagisawa, T., Okishiro, N., Imazato, M., Yasuyuki, K., Sato, Y., Tamura, S., and Noguchi, S. Potential of reduction in total tumor volume measured with 3D-MRI as a prognostic factor for locally-advanced breast cancer patients treated with primary chemotherapy. *Breast J.* 14: 523-531, 2008.
 - 5) Arai, T., Miyoshi, Y., Kim, S. J., Akazawa, K., Maruyama, N., Taguchi, T., Tamaki, Y., and Noguchi, S. Association of GSTP1 expression with resistance to docetaxel and paclitaxel in human breast cancers. *Eur J Surg Oncol.*, 34: 734-738, 2008.
 - 6) Ikeda, J., Morii, E., Liu, Y., Qiu, Y., Nakamichi, N., Jokoji, R., Miyoshi, Y., Noguchi, S., and Aozasa, K. Prognostic significance of CD55 expression in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 14: 4780-4786, 2008.
 - 7) Kim, S. J., Nakayama, S., Miyoshi, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., Matsushima, T., Torikoshi, Y., Tanaka, S., Yoshida, T., Ishihara, H., and Noguchi, S. Determination of the specific activity of CDK1 and CDK2 as a novel prognostic indicator for early breast cancer. *Ann Oncol.* 19: 68-72, 2008.
 - 8) Kotsuma, Y., Tamaki, Y., Nishimura, T., Tsubai, M., Ueda, S., Shimazu, K., Jin Kim, S., Miyoshi, Y., Tanji, Y., Taguchi, T., and Noguchi, S. Quantitative assessment of mammographic density and breast cancer risk for Japanese women. *Breast.* 17: 29-37, 2008.
 - 9) Miyoshi, Y., Kurosumi, M., Kurebayashi, J., Matsuura, N., Takahashi, M., Tokunaga, E., Egawa, C., Masuda, N., Kim, S. J., Okishiro, M., Yanagisawa, T., Ueda, S., Taguchi, T., Tamaki, Y., and Noguchi, S. Topoisomerase IIalpha-positive and BRCA1-negative phenotype: Association with favorable response to epirubicin-based regimens for human breast cancers. *Cancer Lett.*, 264: 44-53, 2008.
 - 10) Miyoshi, Y., Kurosumi, M., Kurebayashi, J., Matsuura, N., Takahashi, M., Tokunaga, E., Egawa, C., Masuda, N., Kim, S. J., Okishiro, M., Yanagisawa, T., Ueda, S., Taguchi, T., Tamaki, Y., and Noguchi, S. Low nuclear grade but not cell proliferation predictive of pathological complete response to docetaxel in human breast cancers. *J Cancer Res Clin Oncol.* 134: 561-567, 2008.
 - 11) Nakayama, S., Miyoshi, Y., Ishihara, H., and Noguchi, S. Growth-inhibitory effect of adiponectin via adiponectin receptor 1 on human breast cancer cells through inhibition of S-phase entry without inducing apoptosis. *Breast Cancer Res Treat.*, 112: 405-410, 2008.
- ### 2. 学会発表
- 1) Kim S. J. et al. Ratio of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) activity to CDK2 activity after ex vivo paclitaxel treatment predicts response

to paclitaxel in human breast cancer. San Antonio Breast Cancer Symposium. Dec. 14, 2008 San Antonio, TX, USA

H. 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

固形癌の臨床試験に付随するバイオマーカー探索とその応用に関する研究

研究分担者 西尾 和人 近畿大学医学部ゲノム生物学教室 教授

研究要旨

胃癌高発現の新規癌関連遺伝子SRPX2の機能解析：臨床検体に対するマイクロアレイ発現解析により同定した新規癌遺伝子候補SRPX2遺伝子の機能解析を行った。SRPX2遺伝子発現は胃癌、大腸癌、肺癌細胞株で発現上昇し、臨床検体ではSRPX2遺伝子の高発現が臨床的予後不良因子であることを示した。SRPX2蛋白は高度な翻訳後修飾を受けて細胞外へ分泌されること、FAKを介して胃癌細胞株の細胞接着能・遊走機能を亢進することを示した。また生化学的解析によりSRPX2は新規コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであることを証明した。これらの知見はSRPX2遺伝子の生物学的機能を初めて明らかにしたことのみならず、分子腫瘍学領域においても新しい癌関連分子として転移・浸潤メカニズムの解明につながる研究結果と考えられる。

A. 研究目的

昨年度までに胃癌臨床検体50例に対するDNAマイクロアレイの解析により、新規癌遺伝子候補としてSRPX2遺伝子(Sushi repeat containing protein, X-linked 2)を同定した。本研究はSRPX2の未知の生物学的な機能を明らかにすることによりSRPX2遺伝子の癌遺伝子としての可能性を検討し、腫瘍マーカー並びに薬剤的候補としてのtarget validationを行う。

B. 研究方法

SRPX2遺伝子発現の検討では、リアルタイムRT-PCR法を用いて21の正常組織、57例の臨床検体、32株の癌細胞株のcDNAに対して遺伝子発現の検討を行った。またSRPX2遺伝子の強制発現株を樹立することでSRPX2蛋白発現分布および強制発現細胞の増殖・接着・遊走機能の変化を検討した。細胞の増殖能はCell growth assayにて、接着能は蛋白を固層化して行うAdhesion assayで、遊走能はBoyden chamberを用いたMigration assay及びスクラッチ法を用いたWound healing assayにてそれぞれ評価を行った。SRPX2、GFP、FAK、リン酸化FAKの蛋白発現はウエスタンブロット法を用いて検出した。SRPX2翻訳後修飾の検討では、精製SRPX2蛋白に対しグリコサミドグリカン分解酵素処理およびHPLCを用いてグリコサミドグリカン鎖の二糖組成分析を行った。

(倫理面への配慮)

臨床サンプルの解析は当該施設（国立がんセンター、近畿大学医学部）の倫理委員会の承認を得たのち（平成15年厚生労働省告示第255号）に準じ実施した。

C. 研究結果

定量的RT-PCR法によるSRPX2遺伝子発現の検討ではがん細胞株では胃癌・大腸癌・肺癌株で高発現であっ

た。臨床検体を用いた検討では胃癌部で正常組織部と比較して約8倍高発現であった。SRPX2発現と57例の臨床検体の患者背景との相関を解析したところ、有意な予後不良因子であることを示した。SRPX2強制発現細胞株による検討では、SRPX2蛋白は細胞質への局在および分泌型の存在が明らかとなった。SRPX2強制発現細胞は細胞増殖能においては変化が認められなかったが、細胞遊走能の亢進を認めた。次に分泌型SRPX2蛋白の機能解析のために胃癌細胞株を用い分泌型SRPX2蛋白存在下にMigration assayを行ったところSNU-16細胞の細胞遊走能亢進が誘導された。またSRPX2蛋白を固層化して行ったAdhesion assayにおいてはSNU-16細胞およびHSC-39細胞に対して著明な細胞接着能の亢進、FAKのリン酸化レベルの亢進が誘導された。

次にSRPX2蛋白は高度な糖修飾を受けていることから生化学的な蛋白解析を行った。コンドロイチナーゼABCを用いた酵素処理では糖鎖修飾は完全に消化された。さらに解析を行いSRPX2蛋白には新規のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンであることが明らかになった。SRPX2蛋白に結合するグリコサミドグリカン鎖に対する二糖硫酸基解析では大部分が Δ Di-OS-CSで一部 Δ Di-4S-CSを含むコンドロイチン硫酸であることを示した。

D. 考察

本研究によりSRPX2はがん細胞の遊走・接着に関連する生物学的機能を明らかにし、分泌型の新規コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであることを証明した。分子腫瘍学領域においても新しい癌関連分子として転移・浸潤メカニズムの解明につながるとともに、癌治療標的分子として適切であることを示した。また腫瘍マーカーとしての臨床的意義を検討するために、抗体を作製し、免疫染色及び血液中SRPX2レベルの検討を続けている。

E. 結論

胃癌高発現遺伝子であるSRPX2は新規コンドロイチン硫酸プロテオグリカンである。臨床的には胃癌予後不良因子であり、がん細胞の生物学的機能においてはFAKを介して癌細胞の遊走・接着機能を増強する。本遺伝子産物はプロテオグリカンの多様な細胞生物学的機能を有しており、腫瘍マーカーおよび治療標的分子として有望である。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maegawa, M., Arao, T., Yokote, H., Matsumoto, K., Kudo, K., Tanaka, K., Kaneda, H., Fujita, Y., Ito, F., Nishio, K. Epidermal growth factor receptor lacking C-terminal autophosphorylation sites retains signal transduction and high sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Sci.*, 2009, *in press*.
- 2) Takeuchi, K., Shin-Ya, T., Nishio, K., Ito, F. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 modulated JNK activation is critical for apoptosis induced by inhibitor or epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase. *FEBS J.*, 2009, *in press*.
- 3) Okabe, T., Okamoto, I., Tsukioka, S., Uchida, J., Hatashita, E., Yamada, Y., Yoshida, T., Nishio, K., Fukuoka, M., Janne, PA., Nakagawa, K. Addition of S-1 to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib overcomes gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cell lines with MET amplification. *Clin Cancer Res.*, 15(3): 907-13, 2009.
- 4) Kawaishi, M., Fujiwara, Y., Fukui, T., Kato, T., Yamada, K., Ohe, Y., Kunitoh, H., Sekine, I., Yamamoto, N., Nokihara, H., Watabe, T., Shimoda, Y., Nishio, K., Arao, T., Tamura, T., Koizumi, F. Circulating endothelial cells in non-small cell lung cancer patients treated with carboplatin and paclitaxel. *J Thorac Oncol.*, 4(2): 208-13, 2009.
- 5) Yoshioka, M., Sagara, H., Takahashi, F., Harada, N., Nishio, K., Mori, A., Ushio, H., Shimizu, K., Okada, T., Ota, M., Ito, Y., Nagashima, O., Atsuta, R., Suzuki, T., Fukuda, T., Fukuchi, Y., Takahashi, K. Role of multidrug resistance-associated protein 1 in the pathogenesis of allergic airway inflammation. *Am J Physiol-Lung C.*, 296(1): L30-6, 2009.
- 6) Tanaka, K., Arao, T., Maegawa, M., Matsumoto, K., Kaneda, H., Kudo, K., Fujita, Y., Yokote, H., Yanagihara, K., Yamada, Y., Okamoto, I., Nakagawa, K., Nishio, K. SRPX2 is overexpressed in gastric cancer and promotes cellular migration and adhesion. *Int J Cancer*, 124: 1072-80, 2009.
- 7) Matsumoto, K., Shimizu, C., Arao, T., Andoh, M., Katsumata, N., Kohno, T., Yonemori, K., Koizumi, F., Yokote, H., Aogi, K., Tamura, K., Nishio, K., Fujiwara, Y. Identification of predictive biomarkers for response to Trastuzumab using plasma FUCA activity and N-Glycan identified by MALDI-TOF-MS. *J Proteome Res.*, 8(2): 457-62, 2009.
- 8) Kimura, K., Nakagawa, K., Shinkai, T., Eguchi, K., Ohe, Y., Yamamoto, N., Tsuboi, M., Yokota, S., Seto, T., Jiang, H., Nishio, K., Saijo, N., Fukuoka, M. A randomized double-blind, phase II a dose-finding study of Vandetanib (ZD6474) in Japanese patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.*, 3(4): 386-93, 2008.
- 9) Nakayama, T., Hieshima, K., Arao, T., Jin, Z., Nagakubo, D., Shirakawa, A-K., Yamada, Y., Fujii, M., Oiso, N., Kawada, A., Nishio, K., Yoshie, O. Aberrant expression of Fra-2 promotes CCR4 expression and cell proliferation in adult T-cell leukemia. *Oncogene.*, 27(23): 3221-32, 2008.
- 10) Matsumoto, K., Yokote, H., Arao, T., Maegawa, M., Tanaka, K., Fujita, Y., Shimizu, C., Hanafusa, T., Fujiwara, Y., Nishio, K. N-Glycan fucosylation of EGFR modulates receptor activity and sensitivity to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Sci.*, 99(8): 1611-7, 2008.
- 11) Velasco, MA., Tanaka, M., Anai, S., Tomioka, A., Nishio, K., Uemura, H. GFP image analysis in the mouse orthotopic bladder cancer model. *Oncology Rep.*, 20(3): 543-7, 2008.
- 12) Fukai, J., Yokote, H., Yamanaka, R., Arao, T., Nishio, K., Itakura, T. EphA4 promotes cell proliferation and migration through a novel EphA4-FGFR1 signaling pathway in the

- human glioma U251 cell line. *Mol Cancer Ther.*, 7(9): 2768-78, 2008.
- 13) Yanagihara, K., Takigahira, M., Tanaka, H., Arai, T., Aoyagi, Y., Oda, T., Ochiai, A., Nishio, K. Establishment and molecular profiling of a novel human pancreatic cancer panel for 5-FU. *Cancer Sci.*, 99(9): 1859-64, 2008.
 - 14) Fukai, J., Yokote, H., Itakura, T., Nishio, K., Koizumi, F. Anti-tumor activity of cetuximab against malignant glioma cells overexpressing EGFR deletion mutant variant III. *Cancer Sci.*, 99(10): 2062-9, 2008.
 - 15) Honma, K., iwao-Koizumi, K., Takeshita, F., Yamamoto, Y., Yoshida, T., Nishio, K., Nakagawa, S., Kato, K., Ochiya, T. RPM2 gene confers docetaxel resistance in breast cancer. *Nature Med.*, 14(9): 939-48, 2008.
 - 16) Morinaga, R., Okamoto, I., Fujita, Y., Arai, T., Sekijima, M., Nishio, K., Ito, H., Fukuoka, M., Kadota, J., Nakagawa, K. Association of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations with EGFR amplification in advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.*, 99(12): 2455-60, 2008.
 - 17) Yamada, Y., Arai, T., Gotoba, T., Taniguchi, H., Oda, I., Shirao, K., Shimada, Y., Hamaguchi, T., Kato, K., Hamano, T., Koizumi, F., Tamura, T., Saito, D., Shimoda, T., Saka, M., Fukagawa, T., Katai, H., Sasako, M., Nishio, K. Identification of prognostic biomarkers in gastric cancer using endoscopic biopsy samples. *Cancer Sci.*, 99(11): 2193-9, 2008.
 - 18) Sekine, I., Yamamoto, N., Nishio, K., Saijo, N. Emerging ethnic differences in lung cancer therapy. *Br J Cancer*, 99(11): 1757-62, 2008.
2. 学会発表
- 1) Fujita, Y., Ono, N., Takata, T., Patra, R., Velasco, M., Yokote, H., Arai, T., Matsumoto, K., Maegawa, M., Tanaka, K., Kaneda, H., Kudo, K., Abe, Y., Nishio, K. Antitumor activity and mode of action of a unique interlocked molecule rotaxane. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 2008.4.12-16, San Diego.
 - 2) Matsumoto, K., Arai, T., Tanaka, K., Kaneda, H., Kudo, K., Maegawa, M., Fujita, Y., Yamada, Y., Nishio, K. Suppression of CD133 expression by siRNA modulated the expression of the genes associated with differentiation in cancer cells. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 2008.4.12-16, San Diego.
 - 3) Tanaka, K., Arai, T., Maegawa, M., Matsumoto, K., Kudo, K., Kaneda, H., Fujita, Y., Yanagihara, K., Yamada, Y., Okamoto, I., Nakagawa, K., Nishio, K. IMP-3 promotes cellular proliferation activity in gastric cancer. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 2008.4.12-16, San Diego.
 - 4) Kanome, T., Kadofuku, T., Inoue, F., Ohba, M., Yamaoka, T., Ando, K., Kusumoto, S., Nakashima, M., Hirose, T., Horichi, N., Nishio, K., Saijo, N., Adachi, M., Kuroki, T., Ohmori, T. Relationship between MET and EGFR expressions in acquired gefitinib-resistant non-small cell lung cancer. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 2008.4.12-16, San Diego.
 - 5) Arai, T., Koizumi, F., Kaneda, H., Tanaka, K., Maegawa, M., Matsumoto, K., Kudo, K., Fujita, Y., Nishio, K. Microarray analysis for EGFR tyrosine kinase inhibitor resistant cell line. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 2008.4.12-16, San Diego.
 - 6) Velasco, M., Tanaka, M., Saito, K., Anai, S., Nishio, K., Uemura, H. Tumor explant animal model: Aiming towards tailor-made therapy of RCC. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 2008.4.12-16, San Diego.
 - 7) Fukui, T., Kodera, Y., Taguchi, F., Kato, T., Watanabe, T., Masuda, N., Nishio, K., Koizumi, F. Synergistic interactions between the synthetic retinoid Tamibarotene (TM411) and Corticosteroids in human myeloma cells. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 2008.4.12-16, San Diego.
 - 8) Yoshida, T., Okamoto, I., Okabe, T., Iwasa, T., Satoh, T., Nishio, K., Nakagawa, K. Matuzumab and cetuximab activate the epidermal growth factor receptor but fail to trigger downstream signaling by akt or erk. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 2008.4.12-16, San Diego.
 - 9) Maegawa, M., Arai, T., Matsumoto, K., Kudo,

K., Tanaka, K., Kaneda, H., Fujita, Y., Ito, F., Nishio, K. Cells expressing EGFR lacking C-terminal are still hypersensitive to EGFR tyrosine kinase inhibitor. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 2008.4.12-16, San Diego.

- 10) Kaneda, H., Arao, T., Tanaka, K., Maegawa, M., Matsumoto, K., Kudo, K., Fujita, Y., Okamoto, I., Nakagawa, K., Nishio, K. FOXQ1 is a novel p21 regulator in colorectal cancer cells. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 2008.4.12-16, San Diego.

H. 知的財産等の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

（特許出願中）

1. 5員複素環化合物を有効成分とする抗ガン剤および新規5員複素環化合物
（特願2008-109599）
2. N結合型糖鎖を利用した膵臓癌の診断方法
（特願2008-123391）
3. 胃癌の判定方法
（特願2008-126457）
4. ロタキサン化合物及び抗ガン剤
（特願2008-270424）

（特許公開）

1. 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
（特開2008-118915）

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし