

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

新しい薬物療法の導入とその最適化に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 田村 友秀

平成22(2010)年 3月

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

新しい薬物療法の導入とその最適化に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 田村 友秀

平成22(2010)年 3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| 新しい薬物療法の導入とその最適化に関する研究----- | 1 |
| 田村友秀                        |   |

### II. 分担研究報告

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| 分子標的薬剤の原理の証明と生物学的マーカーに関する臨床研究----- | 6 |
| 田村友秀                               |   |

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| 分子標的薬物の効率的な臨床評価法に関する研究----- | 9 |
| 南博信                         |   |

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 血管新生阻害薬の効果を予測するバイオマーカーの確立を目指した研究----- | 11 |
| 小泉史明                                  |    |

|                           |    |
|---------------------------|----|
| 分子標的薬を含む薬物治療最適化の基盤研究----- | 14 |
| 桑野信彦                      |    |

|                        |    |
|------------------------|----|
| 抗がん剤の分子標的評価と最適化研究----- | 16 |
| 掛谷秀昭                   |    |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 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----- | 18 |
| 杉本芳一                               |    |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 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----- | 20 |
| 中川和彦                            |    |

|                      |    |
|----------------------|----|
| 乳癌の化学療法効果予測法の開発----- | 24 |
| 野口真三郎                |    |

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| 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----- | 26 |
| 西尾和人                             |    |

|                          |    |
|--------------------------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- | 28 |
|--------------------------|----|

|                      |    |
|----------------------|----|
| IV. 研究成果の刊行物・別刷----- | 33 |
|----------------------|----|

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）  
総括研究報告書

新しい薬物療法の導入とその最適化に関する研究

研究代表者 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

新しい薬物療法の最適化を目指した、バイオマーカー研究と薬剤感受性規定因子解析を行い、以下の成果を得た。(1) EGFR-TKIによる急性肺障害に関わる遺伝子多型を見出した。(2) 乳癌遺伝子発現プロファイルから化学療法効果予測系を樹立した。(3) HER2阻害剤の耐性に *PIK3CA* 遺伝子変異が関わる。(4) ソラフェニブは KRAS 野生型肺癌細胞では B-RAF を KRAS 変異細胞では C-RAF を標的に効果を発揮する。(5) スニチニブはリンパ管新生を阻害してリンパ節転移を抑制する。(6) ボルテゾミブの血管内皮細胞に対する阻害作用とアポトーシス誘導の機序を明らかにした。(7) C7orf24 遺伝子発現について転写調節機構と NF- $\kappa$ B 関与を明らかにした。(8) 肺癌細胞において YB-1 は EGFR, HER2/3, Met 発現および EGFR-TKI 感受性に関与した。(9) ヒト ABCB5 は、膜貫通領域と ATP 結合領域を持つ 1257 アミノ酸の ABC 輸送体である。

研究分担者

|       |                              |      |
|-------|------------------------------|------|
| 南 博信  | 神戸大学大学院医学研究科<br>内科学講座        | 特命教授 |
| 小泉史明  | 国立がんセンター研究所<br>腫瘍ゲノム解析・情報研究部 | 室長   |
| 桑野信彦  | 九州大学 先端融合医療レド<br>ックスナビ研究拠点   | 特任教授 |
| 掛谷秀昭  | 京都大学大学院薬学研究科                 | 教授   |
| 杉本芳一  | 慶應義塾大学薬学部                    | 教授   |
| 中川和彦  | 近畿大学医学部                      | 教授   |
| 野口眞三郎 | 大阪大学大学院医学系研究科                | 教授   |
| 西尾和人  | 近畿大学医学部                      | 教授   |

び分担研究報告書に記載する。

(倫理面への配慮)

基礎研究においては、施設の倫理規定等に従って、動物実験は適正飼育を行い、苦痛を最小限に抑えるよう配慮する。臨床研究においては、ヘルシンキ宣言、臨床研究およびヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、IRB 承認、被験者の同意、個人情報の遵守を必須とした。

C. 研究結果

(1) EGFR-TKI (ゲフィチニブ、エルロチニブ)による急性肺障害発症に関わる遺伝子多型の探索を目的に、肺癌患者の DNA を用いて、疾患群 12 例、対照群 58 例の疾患-対照関連解析を行った。候補遺伝子アプローチでは、発症率の人種差に矛盾せず、機能的にも説明が可能な急性肺障害への関与が疑われる遺伝子多型が見出された。網羅的アプローチでは、連鎖不平衡マップを用い、関連の可能性のある遺伝子群を選択した。

(2) 乳癌患者に対する術前化学療法 (パクリタキセル→アンスラサイクリン療法) 施行前に採取した腫瘍組織の遺伝子発現プロファイル解析 (マイクロアレイ) を実施し、有効例と無効例で発現に差のある 70 遺伝子を用いた高精度の効果予測システムを作成した (感度=91%、陰性的中率=93%)。

A. 研究目的

分子標的治療薬を中心とした新しい薬物療法の最適化を目指す。具体的には、(1) 臨床検体を用いた効果・毒性に関わるバイオマーカーの探索、(2) 薬剤感受性/耐性規定因子の解析と新薬の最適化研究、を実施する。

B. 研究方法

本研究組織は、研究代表者の他、8名の分担研究者で構成される。研究方法の詳細は、C項およ

(3) HER2 陽性乳癌細胞株を用いた研究で、抗HER2 抗体と小分子 HER2 キナーゼ阻害薬 (CL-378, 785) の耐性に *PIK3CA* 遺伝子変異が関わることを示した。胃癌細胞株では、遺伝子増幅を伴う受容体型チロシンキナーゼをコアとした受容体間のシグナルネットワークが存在し、PI3K を活性化していることが示唆された。

(4) ソラフェニブは KRAS 野生型非小細胞肺癌細胞では B-RAF を、KRAS 変異株非小細胞肺癌細胞では C-RAF をターゲットにして抗腫瘍効果を発揮していることを見出した。これは KRAS 遺伝子の状態によりその下流の RAF アイソタイプの役割が異なることを示した最初の所見である。

(5) スニチニブの腫瘍リンパ管新生に対する効果を検討した。スニチニブは、リンパ管内皮細胞の VEGF-C シグナル伝達を阻害し、増殖、遊走、管腔形成を抑制した。乳癌の動物モデルにおいて、スニチニブは血管新生阻害に加えてリンパ管新生を阻害し、リンパ節への転移を抑制した。

(6) プロテアソーム阻害薬ボルテゾミブは、血管内皮細胞に対して、VEGFR2 シグナル非依存的に血管新生阻害作用、アポトーシス誘導作用を示した。ボルテゾミブが、cyclin B1 および wee1 に対して主作用であるユビキチン化を亢進させ、Cdc2-cyclin B 複合体のキナーゼ活性を抑制して細胞周期を停止させるメカニズムを明らかにした。

(7) 膀胱癌をはじめ多くの癌細胞において高発現している C7orf24 遺伝子の発現調節機構を解析した結果、C7orf24 遺伝子の転写調節領域を明らかにするとともに、転写因子 NF-Y の重要な関与を明らかにし、C7orf24 および NF-Y が癌の分子標的となりうる可能性を示唆した。

(8) NDRG1/Cap43 による、ヒト膀胱癌細胞の CXCL12 ケモカイン生産、増殖・血管新生の抑制には、NF- $\kappa$ B シグナルが関与した。肺癌細胞において YB-1 ノックダウンにより EGFR, HER2, HER3, Met の発現が低下し、EGFR-TKI 感受性が低下した。また、核内酸化ストレス核酸 8-オキシグアニン (8-oxdG) の発現が EGFR 感受性変異と相関した。

(9) ヒト ABCB5 が、1257 アミノ酸の細胞膜タンパク質であり、6 回膜貫通領域と ATP 結合領域をそれぞれ 2 つずつ持つ、P-gp によく似た構造の ABC 輸送体であることを明らかにした。ヒト ABCB5 は、前立腺、精巣などに発現し、抗癌剤排出ポンプとして機能してその効果に影響すると考えられる。

## E. 結論

本研究で得られた、分子標的薬の効果毒性など薬力学的作用のメカニズム、規定因子の解明、予測システムの樹立は、予後・治療効果の予測バイオマーカーとして有望であり、個別化治療への応用も期待される。また、耐性機構の解明や新たな標的分子の探索は、治療効果増強、創薬に向け重要な知見といえる。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ando, R., Makino, Y., Tamura, T., Yamamoto, N., Nishigaki, R., Kimura, T., Yokote, N., Yamamoto, H. Simple and sensitive HPLC method for determination of amrubicin and amrubicinolin human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr.* 4(3): 301-306, 2010.
- 2) Yamamoto, N., Tamura, T., Kurata, T., Yamamoto, N., Sekine, I., Kunitoh, H., Ohe, Y., Saijo, N. A dose-finding and pharmacokinetic study of nedaplatin in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 65(1):79-88, 2009.
- 3) Sekine, I., Sumi, M., Ito, Y., Tanai, C., Nokihara, H., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Tamura, T. Gender Difference in Treatment Outcomes in Patients with Stage III Non-small Cell Lung Cancer Receiving Concurrent Chemoradiotherapy. *Jpn J Clin Oncol.*, 39(11):707-712, 2009.
- 4) Tanai, C., Nokihara, H., Yamamoto, S., Kunitoh, H., Yamamoto, N., Sekine, I., Ohe, Y., Tamura, T. Characteristics and outcomes of patients with advanced non-small-cell lung cancer who declined to participate in randomised clinical chemotherapy trials. *Br J Cancer*, 100(7):1037-1042, 2009.
- 5) Goto, Y., Sekine, I., Sekiguchi, H., Yamada, K., Nokihara, H., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Tamura, T. Differences in the quality of information on the internet about lung cancer between the United States and Japan. *J Thorac Oncol.*, 4(7):829-833, 2009.
- 6) Sekine, I., Shimizu, C., Nishio, K., Saijo, N., Tamura, T. A literature review of

- molecular markers predictive of clinical response to cytotoxic chemotherapy in patients with breast cancer. *Int J Clin Oncol.*, 14(2):112-119, 2009.
- 7) Kataoka, Y., Mukohara, T., Shimada, H., Saijo, N., Hirai, M., Minami, H. Association between gain-of-function-mutations in PIK3CA and resistance to HER2-targeted agents in HER2-amplified breast cancer cell lines. *Ann Oncol.*, 21(2): 255-262, 2010.
  - 8) Mukohara, T., Shimada, H., Ogasawara, N., Wanikawa, R., Shimomura, M., Nakatsura, T., Ishii, G., Park, JO., Jänne, PA., Saijo, N., Minami, H. Sensitivity of breast cancer cell lines to the novel Insulin-like Growth Factor-1 Receptor (IGF-1R) inhibitor NVP-AEW541 is dependent on the level of IRS-1 expression. *Cancer letters*, 282 (1): 14-24, 2009.
  - 9) Nakagawa, K., Minami, H., Kanezaki, 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 ErbB-2 Tyrosine Kinases, in Japanese Patients with Solid Tumors. *Jpn J Clin Oncol.*, 39: 116-123, 2009.
  - 10) Yamamoto, Y., Kosaka, N., Tanaka, M., Koizumi, F., Kanai, Y., Mizutani, T., Murakami, Y., Kuroda, M., Miyajima, A., Kato, T., Ochiya, T. MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Biomarkers.*, 14(7): 529-538, 2009.
  - 11) Fukui, T., Kodera, Y., Nishio, K., Masuda, N., Tamura, T., Koizumi, F. Synergistic interactions between the synthetic retinoid tamibarotene and glucocorticoids in human myeloma cells. *Cancer Sci.*, 100(6): 1137-1143, 2009.
  - 12) Kawaishi, M., Fujiwara, Y., Fukui, T., Kato, T., Yamada, K., Ohe, Y., Kunitoh, H., Sekine, I., Yamamoto, N., Nokihara, H., Watabe, T., Shimoda, Y., Arao, 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.
  - 13) Basaki, Y., Taniguchi, K., Izumi, H., Kubo, T., Hosoi, F., Watari, K., Nakano, K., Kawaguchi, H., Ohno, S., Kohno, K., Ono, M., and Kuwano, M. Y-box protein-1 (YB-1) promotes cell cycle progression through CDC6-dependent pathway in human cancer cells. *Eur J Cancer*, in press, 2009.
  - 14) Kidani, A., Izumi, H., Yoshida, Y., Kashiwagi, E., Ohmori, H., Tanaka, T., , Kuwano, M. and Kohno, K. Thioredoxin2 enhances the damaged DNA binding activity of mtTFA through direct interaction. *Int J Oncol.*, 35: 1435-1440, 2009.
  - 15) Kashihara, M., Azuma, K., Kawahara, A., Basaki, Y., Hattori, S., Yanagawa, T., Terazaki, Y., Takamori, S., Shirouzu, K., Aizawa, H., Nakao, K., Kage, M., Kuwano, M., Ono, M. Nuclear Y-box binding protein-1 (YB-1) a predictive marker of prognosis, is correlated with expression of HER2/ErbB2 and HER3/ErbB3 in non-small cell lung cancer. *J Thoracic Oncology*, 4: 1066-1074, 2009.
  - 16) 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 IKKbeta expression. *Cancer Res.*, 69: 4983-4991, 2009.
  - 17) 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  $\alpha$ -tubulin predicts good response to taxane-based chemotherapy in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Clinic Cancer Res.*, 15: 1473-1480, 2009.
  - 18) Hayashi, Y., Sankar, K., Ishikawa, H., Nozawa, Y., Mizoue, K., Takeya, H. Total synthesis and determination of the absolute configuration of FD-838, a naturally occurring azaspirobicyclic product. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19 (14): 3863-3865, 2009.
  - 19) 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 fumitremorgen biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *ChemBioChem.*, 10 (5): 920-928, 2009.
  - 20) Katayama, R., Koike, S., Sato, S., Sugimoto, Y., Tsuruo, T., Fujita, N. Dofequidar fumarate sensitizes cancer

- tem-like side population cells to chemotherapeutic drugs by inhibiting ABCG2/BCRP-mediated drug export. *Cancer Sci.*, 100(11): 2060-2068, 2009.
- 21) Noguchi, K., Kawahara, H., Kaji, A., Katayama, K., Mitsuhashi, J., Sugimoto, Y. Substrate-dependent bidirectional modulation of P-glycoprotein-mediated drug resistance by erlotinib. *Cancer Sci.*, 100(9): 1701-1707, 2009.
  - 22) Mashima, T., Sato, S., Okabe, S., Miyata, S., Matsuura, M., Sugimoto, Y., Tsuruo, T., Seimiya, H. Acyl-CoA synthetase as a cancer survival factor: its inhibition enhances the efficacy of etoposide. *Cancer Sci.*, 100(8): 1556-1562, 2009.
  - 23) 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.*, 29(4): 1059-1065, 2009.
  - 24) Noguchi, K., Katayama, K., Mitsuhashi, J., Sugimoto, Y. Functions of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev.*, 61(1): 26-33, 2009.
  - 25) 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.
  - 26) Takeda, M., Okamoto, I., Fujita, Y., Arai, T., Ito, H., Fukuoka, M., Nishio, K., Nakagawa, K. De Novo Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR Mutation-Positive Patients with Non-small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.*, 5(3): 399-400, 2010.
  - 27) Yoshida, T., Okamoto, I., Okamoto, W., Hatashita, E., Yamada, Y., Kuwata, K., Nishio, K., Fukuoka, M., Jänne, PA., Nakagawa, K. Effects of Src inhibitors on cell growth and epidermal growth factor receptor and MET signaling in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cells with acquired MET amplification. *Cancer Sci.*, 101(1): 167-172, 2010.
  - 28) Iwasa, T., Okamoto, I., Suzuki, M., Hatashita, E., Yamada, Y., Fukuoka, M., Ono, K., Nakagawa, K. Inhibition of Insulin-Like growth factor 1 receptor by CP-751,871 radiosensitizes Non-Small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res.*, 15(16): 5117-5125, 2009.
  - 29) Takezawa, K., Okamoto, I., Yonesaka, K., Hatashita, E., Yamada, Y., Fukuoka, M., Nakagawa, K. Sorafenib inhibits non-small cell lung cancer cell growth by targeting B-RAF in KRAS wild-type cells and C-RAF in KRAS mutant cells. *Cancer Res.*, 69(16): 6515-6521, 2009.
  - 30) 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): 907-913, 2009.
  - 31) Tanaka, K., Arai, 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.
  - 32) Tanei, T., Morimoto, K., Shimazu, K., Kim, S. J., Tanji, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., Noguchi, S. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res.*, 15: 4234-4241, 2009.
  - 33) Okishiro, M., Taguchi, T., Jin Kim, S., Shimazu, K., Tamaki, Y., Noguchi, S. Genetic polymorphisms of CYP2D6 10 and CYP2C19 2, 3 are not associated with prognosis, endometrial thickness, or bone mineral density in Japanese breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen. *Cancer*, 115:952-961, 2009.
  - 34) Okishiro, M., Taguchi, T., Kim, S. J., Tanji, Y., Shimazu, K., Tamaki, Y., Noguchi, S. Incidence of joint symptoms and bone fractures in Japanese postmenopausal breast cancer patients treated with adjuvant anastrozole. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 135:823-827, 2009.
  - 35) Kim, S. J., Taguchi, T., Shimazu, K., Tanji, Y., Tamaki, Y., Noguchi, S. Good Response

to Paclitaxel Predicts High Rates of Pathologic Complete Response for Breast Cancer Patients Treated Preoperatively with Paclitaxel Followed by 5-Fluorouracil, Epirubicin and Cyclophosphamide. *Oncology*, 77: 134-139, 2009.

- 36) Matsumoto, K., Arao, T., Tanaka, K., Kaneda, H., Kudo, K., Fujita, Y., Tamura, D., Aomatsu, K., Tamura, T., Yamada, Y., Saijo, N., Nishio, K. mTOR signal and hypoxia-inducible factor-1 alpha regulate CD133 expression in cancer cells. *Cancer Res.*, 69(18): 7160-7164, 2009.
- 37) Maegawa, M., Arao, T., Yokote, H., Matsumoto, K., Kudo, K., Tanaka, K., Kaneda, H., Fujita, Y., Ito, F., Nishio, K. EGFR mutation up-regulates EGR1 expression through the ERK pathway. *Anticancer Res.*, 29(4): 1111-1117, 2009.
- 38) Matsumoto, K., Shimizu, C., Arao, T., Andoh, M., Katsumata, N., Koho, T., Yonemori, K., Koziyumi, 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.
- 39) 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.*, 100(3): 552-557, 2009.
- 40) 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 of epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase. *FEBS J.*, 276(5): 1255-1265, 2009.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

##### 1. 特許取得

(特許公開)

- ・ 胃癌の判定方法 (特許公開 2009-276153)
- ・ 結合型糖鎖を利用した膵臓癌の診断方法 (特

許公開 2009-270996)

- ・ 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 (特許公開 2009-256274)
  - ・ 抗癌剤の有効性予測方法 (特許公開 2009-244147)
  - ・ 乳癌術前化学療法に対する感受性の判定方法 (特許公開 2009-272501)
- (特許出願中)
- ・ ロタキサン化合物及び抗ガン剤 (PCT/JP2009/005503 国外)
  - ・ 治療効果観察のためのバイオマーカー使用方法又はシステム (EP 09154964.2 国外)
  - ・ A method of predicting the effect of a drug (PCT/JP2010/051304)

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし



「分子標的薬剤の原理の証明と生物学的マーカーに関する臨床研究」に関する研究

分担研究者 田村友秀 国立がんセンター中央病院 総合病棟部部长

研究要旨

EGFR-TKI（ゲフィチニブ、エルロチニブ）による急性肺障害発症に関わる遺伝子多型を探索するため、当院でEGFR-TKIによる治療が行われた進行非小細胞肺癌患者のDNAを用いて疾患-対照関連解析を行った。疾患群として12例、対照群として58例を抽出した。遺伝子多型のアッセイ方法として、候補遺伝子アプローチと網羅的アプローチを行い、前者はEGFR-TKIの薬理作用を考慮した114遺伝子、768SNPをmRNA領域にほぼ限定して作製したものを、後者はエクソン部分を多く含むヒューマンエクソン510Sデュオを用いたアプローチを行った。候補遺伝子アプローチでは、発症率の人種差に矛盾せず、機能的にも説明が可能な急性肺障害への関与が疑われる遺伝子多型が見出された。また、網羅的アプローチから選択された遺伝子に関して連鎖不平衡マップを作成し、急性肺障害と関連する可能性のある遺伝子を選択した。

A. 研究目的

EGFR-TKI (EGFR-tyrosine kinase inhibitor) (ゲフィチニブ、エルロチニブ) 投与の際に最も注意が必要な有害事象が間質性肺炎 (interstitial lung disease: ILD) であり、特異的な急性の発症様式と致死率の高さと併せて一時期社会問題にまでなった。EGFR-TKIによる肺障害が、①発症率に人種差がある、②急性発症、画像所見、治療に対する抵抗性、致命的な経過といった点で比較的単一の病型を呈する、という特徴をもち、また、これまでに間質性肺炎の発症・増悪に関連する遺伝子多型の報告が数多くあることから、我々は、「EGFR-TKIによる急性肺障害の発症には、単遺伝子、または少数の遺伝子多型 (変異) が関与する」という仮説を立てた。本研究の目的は、症例-対照関連解析により、EGFR-TKIによる薬剤性肺障害の発症に関わる遺伝子多型を探索することである。

B. 研究方法

EGFR-TKIにより薬剤性肺障害を発症した症例群とその対照群の遺伝子多型を測定し、疾患-対照関連解析により薬剤性肺障害に関与する遺伝子多型を探索する。

遺伝子多型のタイピングには、厚生労働省ミレニアム・ゲノム・プロジェクト (「遺伝子解析によるがん対策・創薬推進事業」) の一環として行われている

「がんの易罹患性に関わるSNPs等遺伝子多型の同定とその臨床応用を目指す研究」 (国立がんセンター倫理審査受付番号G12-03) のために既に提供され、連続可能匿名化された試料 (末梢血単核球DNA) を用いる。

・ 疾患群: EGFR-TKI投与を受け急性肺障害を発症した症例12例。

・ 対照群: 1ヶ月以上EGFR-TKI投与を受けたが、急性肺障害を起こさなかった症例58例。

A. 候補遺伝子アプローチ

Illumina Golden Gate Custom Panelを用いて、これまでに間質性肺疾患の発症にかかわることが報告されている遺伝子変異に、EGFR-TKIの薬理作用を考慮した114遺伝子、768SNPをmRNA領域にほぼ限定して作製したものをを用いた。

B. 網羅的遺伝子アプローチ

エクソン部分を多く含むIllumina HumanExon510S-Duo Bead Chipを用いて、ゲノム網羅的に511354SNPsをタイピングした。

(倫理面への配慮)

本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」を遵守して実施する。試料は、厚生労働省ミレニアム・ゲノム・プロジェクト「遺伝子解析によるがん対策・創薬推進事業」の一環として行われている「がんの易罹患性に関わるSNPs等遺伝子多型の同定とその臨床応用を目指す研究」 (国立がんセンター倫理審査受付番号G12-03) のために患者の同意の上で採取された末梢血単核球DNAであり、既に試験計画に従って当院個人情報管理室により連結可能匿名化されている。本研究は、「抗がん剤による薬剤性肺障害の発症に関わる遺伝子多型の研究」として、遺伝子倫理委員会にて承認済みである。

C. 研究結果

A. 候補遺伝子解析

Illumina Golden Gate Custom Panelを用いて、114遺伝子、768SNPのタイピングを、症例 (12例)、対象 (56例) において施行した。一つの遺伝子 (X) の多型において、対照群ではAのアレルを持つ症例がいなかったのに対して、ILD症例群では12例中4例 (33%) がAアレルを保有していた (表1)。本多型は、急性肺障害の発症率の人種差に矛盾せず、機能的にも説明が

可能なものであった (表2)。

表1. 遺伝子Xの多型におけるアレル頻度

| A / G   | AA+AG | GG | Total | Fisher's exact test | Odds ratio |
|---------|-------|----|-------|---------------------|------------|
| ILD     | 4     | 8  | 12    | p=0.00061           | NA         |
| Control | 0     | 56 | 56    |                     |            |
| Total   | 4     | 64 | 68    |                     |            |

表2. 本多型の人種差に関する報告

| Population      | Sample Ascertainment |                    | Source | Genotype Detail <sup>NEW</sup> |       |       | Alleles |       |
|-----------------|----------------------|--------------------|--------|--------------------------------|-------|-------|---------|-------|
|                 | Individual Group     | Chrom. Sample Cnt. |        | A/G                            | G/G   | HWP   | A       | G     |
| EGP_YORUB-PANEL | Sub-Saharan African  | 24                 | IG     | 1.000                          |       |       | 1.000   |       |
| EGP_HISP-PANEL  | Hispanic             | 44                 | IG     | 0.045                          | 0.955 | 1.000 | 0.023   | 0.977 |
| EGP_CEPH-PANEL  | European             | 44                 | IG     | 1.000                          |       |       | 1.000   |       |
| EGP_AD-PANEL    | African American     | 30                 | IG     | 1.000                          |       |       | 1.000   |       |
| EGP_ASIAN-PANEL | Asian                | 48                 | IG     | 1.000                          |       |       | 1.000   |       |

## B. 網羅的遺伝子解析

Illumina HumanExon510S-Duo Bead Chipを用いて、ゲノム網羅的に511354SNPsを症例、対象群においてタイプングした。本解析により選択された上位3つの多型において連鎖不平衡マップを作成し、疾患と関連する可能性のある遺伝子を選択した。一つの多型の連鎖不平衡マップを示す (図1)。

## D. 考察

EGFR-TKI投与の際に最も注意が必要な有害事象がILDであり、急性の発症様式が多く、致死率も高い。临床上、既存の間質性肺炎・肺線維症や喫煙歴、男性、高齢、心疾患の合併は抗がん剤によるILDの危険因子として挙げられるが、実際にはこうした危険因子をもたない患者においてもILDが発症することは間々あり、臨床所見だけからILD発症のリスクを完全に回避することはできない。今回、我々のアプローチから、EGFR-TKIのILDに関わる多型候補がいくつか選択された。本研究の特徴は、症例選択の過程において、肺を専門とする医師に、一例一例、発症様式を検証して症例を選択したため、質の高い均一な症例選択が実現したことがあげられる。今後は、他施設における症例を追加して、研究結果の検証を行い、その後、多型の機能的解析、前向き臨床試験へと進んでいきたい。ILDの遺伝子多型が同定されれば、EGFR-TKIにおける最も致命的な有害事象であるILDの予測が可能となり、治療の安全性向上に大きく寄与すると考えられる。

## E. 結論

EGFR-TKIによる急性肺障害への遺伝子多型を探索するため、候補遺伝子アプローチと網羅的遺伝子アプローチを行った。候補遺伝子アプローチでは、発症率の人種差に矛盾せず、機能的にも説明が可能な急性肺障害への関与が疑われる遺伝子多型が見出された。また網羅的遺伝子アプローチでは、連鎖不平衡マップ解析

により、新たな候補遺伝子を選択した。

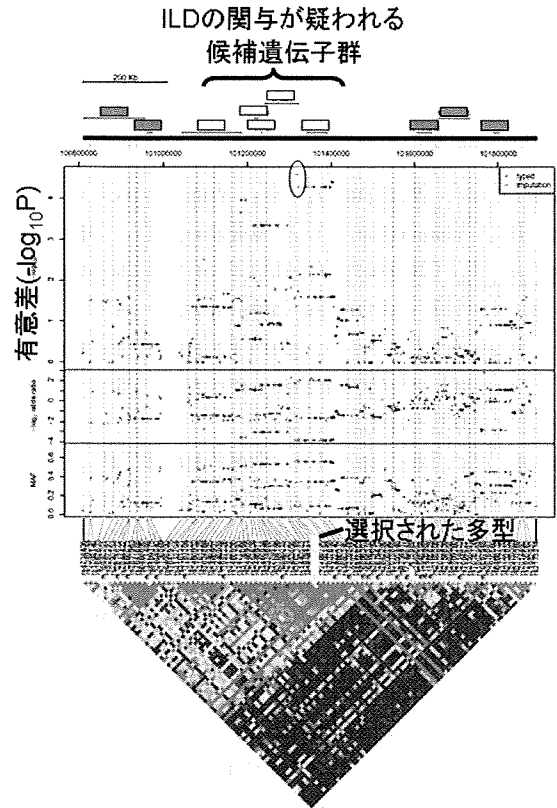


図1. 選択された多型の連鎖不平衡マップ

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

### 1. 論文発表

- 1) Ando, R., Makino, Y., Tamura, T., Yamamoto, N., Nishigaki, R., Kimura, T., Yokote, N., Yamamoto, H. Simple and sensitive HPLC method for determination of amrubicin and amrubicin olin human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study. Biomed Chromatogr., 24 (3):301-306, 2010.
- 2) Matsumoto, K., Arao, T., Tanaka, K., Kaneda, H., Kudo, K., Fujita, Y., Tamura, D., Aomatsu, K., Tamura, T., Yamada, Y., Saijo, N., Nishio, K. mTOR Signal and Hypoxia-Inducible Factor-1 Regulate CD133 Expression in Cancer Cells. Cancer Res., 69(18):7160-7164, 2009.
- 3) Yamamoto, N., Tamura, T., Kurata, T., Yamamoto, N., Sekine, I., Kunitoh, H., Ohe, Y., Saijo, N. A dose-finding and pharmacokinetic study of nedaplatin in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer. Cancer Chemother Pharmacol., 65(1):79-88, 2009.
- 4) Sekine, I., Sumi, M., Ito, Y., Tanai, C., No

- kihara, H., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Tamura, T. Gender Difference in Treatment Outcomes in Patients with Stage III Non-small Cell Lung Cancer Receiving Concurrent Chemoradiotherapy. Jpn J Clin Oncol., 39(11):707-712, 2009.
- 5) Tanai, C., Nokihara, H., Yamamoto, S., Kunitoh, H., Yamamoto, N., Sekine, I., Ohe, Y., Tamura, T. Characteristics and outcomes of patients with advanced non-small-cell lung cancer who declined to participate in randomized clinical chemotherapy trials. Br J Cancer, 100(7):1037-1042, 2009.
- 6) Goto, Y., Sekine, I., Sekiguchi, H., Yamada, K., Nokihara, H., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Tamura, T. Differences in the quality of information on the internet about lung cancer between the United States and Japan. J Thorac Oncol., 4(7):829-33, 2009.
- 7) Fukui, T., Koderu, Y., Nishio, K., Masuda, N., Tamura, T., Koizumi, F. Synergistic interactions between the synthetic retinoid tamibarotene and glucocorticoids in human myeloma cells. Cancer Sci., 100(6):1137-1143, 2009
- 8) Sekine, I., Shimizu, C., Nishio, K., Saijo, N., Tamura, T. A literature review of molecular markers predictive of clinical response to cytotoxic chemotherapy in patients with breast cancer. Int J Clin Oncol., 14(2):112-119, 2009.
- 9) Kawaishi, M., Fujiwara, Y., Fukui, T., Kato, T., Yamada, K., Ohe, Y., Kunitoh, H., Sekine, I., Yamamoto, N., Nokihara, H., Watabe, T., Shimoda, Y., Arao, 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.
- 10) Sekine, I., Nokihara, H., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Tamura, T. Risk factors for skeletal-related events in patients with non-small cell lung cancer treated by chemotherapy. Lung Cancer, 65(2):219-22, 2009.

### 3. その他 特になし

#### H. 知的財産等の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

候補遺伝子アプローチで見出した多型について、特許出願予定である（職務発明届け承認済み）。

##### 2. 実用新案登録

特になし

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 神戸大学大学院医学系研究科内科学講座腫瘍・血液内科学、教授

研究要旨

HER2陽性乳がん細胞株を用いた研究で、抗HER2抗体（trastuzumab）と小分子HER2キナーゼ阻害薬（CL-378, 785）の耐性にPIK3CA遺伝子変異が関わっていることが示された。また胃がん細胞株では、遺伝子増幅を伴う受容体型チロシンキナーゼをコアとした受容体間のシグナルネットワークが存在し、PI3Kを活性化していることが示唆された。これらの知見から、PI3K活性化機構を包括的に把握するシステムの開発が、分子情報に基づいた臓器横断的かつ個別化治療に必要であると考えられる。

A. 研究目的

我々は、分子標的薬の個別化投与に繋がるバイオマーカーを確立するため研究を行っている。本年度は、i) HER2陽性乳がん細胞株の抗HER2療法耐性におけるPIK3CA活性型変異の役割を明らかにすること、ii) 胃がん細胞株における多標的キナーゼ阻害薬GSK1363089の作用メカニズムを明らかにすること、iii) 質量分析計を用いてPI3K活性化タンパクを効率的に同定すること、を目的に取り組んできた。

B. 研究方法

i) 乳がん細胞株の抗HER2療法薬耐性におけるPIK3CA活性型変異の役割

抗HER2モノクローナル抗体(trastuzumab)や小分子HER2キナーゼ阻害薬(CL-378, 785)に対する耐性におけるPIK3CA活性型変異の役割について*in vitro*で検討した。研究にはHER2過剰発現乳がん細胞株で、PIK3CA変異株(n=4)と野生型株(n=4)およびtrastuzumabに長期間曝露し耐性を獲得させたPIK3CA野生型株(BT474-T R)を用いた。これらの細胞にtrastuzumabやCL-378, 785を作用させ、細胞増殖や細胞内シグナルに及ぼす影響について検討した。

ii) 胃がん細胞株における多標的キナーゼ阻害薬、GSK1363089の薬効試験

Met, PDGFR, VEGFRの多標的阻害薬である、GSK1363089の効果を胃がんおよび乳がん細胞株を用いて検討した。

iii) 質量分析計を用いたPI3K活性化タンパクの同定  
胃がんおよび乳がん細胞から抽出したタンパクを、抗PI3K/p85抗体で免疫沈降し、SDS-PAGEで分離した後、銀染色を施す。主なバンドを切り出し、質量分析計で

同定する。

(倫理面への配慮)

これらの研究は、細胞株を用いた*in vitro*の研究であり、各倫理指針には該当しない。

C. 研究結果

i) PIK3CA変異乳がん細胞株は野生型株に比べ、trastuzumabに対して有意に高い耐性を示した。さらにPIK3CA変異株は小分子HER2キナーゼ阻害薬であるCL-378, 785にも比較的耐性を示す一方、BT474-TRは同剤への感受性を保った。これら抗HER2薬の細胞増殖抑制効果とPI3Kシグナル分子、特にS6キナーゼのリン酸化抑制との間には強い相関がみられた(相関係数, 0.811)。これら細胞株はPIK3CAの遺伝子型に関わらずPI3K阻害薬であるLY294002には感受性を保った。

ii) 11種類の細胞株を用いて、GSK1363089の細胞増殖抑制効果をスクリーニングした。その結果、Metに遺伝子増幅のあるKATO-IIIとMKN-45が有意に高い感受性を示した。次に、phospho-RTK (receptor tyrosine kinase) arrayとWestern blot法を用いた、受容体-細胞内シグナルへの影響を検討したところ、MKN-45ではGSK1363089はMetを抑制し、それとcross-talkのあるFGFR3やEGFRファミリー受容体、およびPI3K経路を抑制することが分かった。一方KATO-IIIでは、GSK1363089の効果はMetを介さず、FGFR2を抑制し、それとcross-talkのあるMetやEGFRファミリー受容体、およびPI3K経路を抑制することが分かった。現在、受容体型チロシンキナーゼ間のネットワークの詳細について検討を加えている。

iii) PI3Kの活性化機構が既に知られている細胞株(MKN-45: Met-Gab1-PI3K, MCF-7: IGF1R-IRS1-PI3K)を用いて、現在条件の最適化を目指している。

D. 考察

PI3K経路はがんの生存、増殖に関わる重要な経路であり、魅力的な治療標的といえる。PI3K経路を異常活性化させる機構として、受容体型チロシンキナーゼやPI

*K3CA*の遺伝子増幅/活性化変異、PTENの機能欠失、*Akt*の遺伝子増幅、タンパク同士のcross-talkなどが挙げられる。個々の腫瘍毎にいかなるPI3K経路活性化機構があるかを効率的に把握することは極めて重要であると考えられる。我々は、遺伝子塩基配列やコピー数検索などのgenetic approachと、タンパク相互作用を明らかにするproteomic approachの両方が相補的に必要と考えている。これらの知見がさらに発展すれば、がんの発生した臓器別ではなく、分子情報による臓器横断的かつ個別化した治療が可能になると信じる。

#### E. 結論

細胞毎にPI3Kを活性化させる機構は様々であり、それらを包括的に把握する技術の開発が、分子標的薬の個別化治療に極めて重要である。我々は、従来のgenetic approachと、PI3K活性化タンパクの相互作用を明らかにするproteomic approachの両方を駆使して、これに挑んでいく予定である。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

##### 1. 論文発表

- 1) Kataoka, Y., Mukohara, T., Shimada, H., Saijo, N., Hirai, M., and Minami, H. Gain of function mutations of PIK3CA is associated with resistanceto HER2-targeted agents in HER2-amplified breastcancer cell lines. *Ann Oncol.*, 21:255-262, 2010.

#### H. 知的財産等の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

##### 2. 実用新案登録

##### 3. その他

血管新生阻害薬の効果を予測するバイオマーカーの確立を目指した研究

分担研究者 小泉 史明 国立がんセンター研究所 腫瘍ゲノム解析情報研究部室長

研究要旨

がんのリンパ節転移の程度は予後予測因子であり、また治療方針の決定にも関わっている。これらリンパ節への転移、あるいはリンパ組織からの遠隔転移は主にリンパ管を介していると考えられ、腫瘍リンパ管は、がん治療の標的として期待される。今回スニチニブの腫瘍リンパ管新生に対する効果を検討した。スニチニブは、リンパ管内皮細胞においてVEGF-Cのシグナル伝達をnMレベルで阻害した。またリンパ管内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成を阻害した。乳がんの動物モデルを用いて検討したところ、スニチニブは血管新生阻害に加えてリンパ管新生を阻害し、リンパ節への転移を抑制した。以上の結果から、スニチニブはリンパ節への転移を阻害することで患者にbenefitをもたらす可能性があると考えられる。

A. 研究目的

スニチニブは血管が豊富な腎細胞がんなどにおいて既に承認され、その効果は主にVEGFR-2の活性を阻害して、血管新生阻害作用をもたらすことによると考えられている。一方でマルチキナーゼ阻害剤であるスニチニブはリンパ管新生に重要なVEGF-C-D、VEGFR3シグナルの抑制作用も持つ。本研究の目的は、スニチニブのリンパ管新生抑制作用を検討し、リンパ管新生が、本剤の標的となりうるかを検証することである。

B. 研究方法

- リンパ管内皮細胞に対する増殖抑制効果  
VEGF-C、VEGF-D刺激下で、スニチニブのリンパ管内皮細胞 (Lymphatic endothelial cell (LEC)) の増殖抑制効果を、MTS assayにて検討した。
- VEGF-C、VEGFR-3シグナル伝達抑制作用  
LECを用いて、VEGF-C刺激下のシグナル伝達抑制作用を、免疫沈降法、ウェスタンブロット法により検討した。
- LEC migrationアッセイおよびTube formationアッセイ  
VEGF-C刺激下のLECの遊走能、管腔形成に対する作用を検討した。
- 乳がん細胞同所移植リンパ節転移モデル  
ルシフェラーゼ活性をもつリンパ節易転移乳がん細胞株MDA-MB-231LN (luciferase)をSCIDマウスに同所移植し、リンパ節転移抑制作用をIVISシステムを用いて検討した。また移植腫瘍組織におけるリンパ管新生抑制作用を、免疫組織化学検査によりlymph vessel density (LVD)を算出することで比較検討した。

(倫理面への配慮)

血管新生阻害薬の効果を予測するバイオマーカーの確立を目指した研究は、臨床検体を用いる際は「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、国立がんセンター

倫理審査委員会承認済みの「固形がん患者の臨床検体を用いた抗悪性腫瘍薬の薬力学的作用の解析・評価とそのバイオマーカーの探索研究」に基づき施行される。本年度の研究は、マウスを用いた研究であり、国立がんセンター動物倫理委員会において「新規抗癌剤の薬効評価と作用機序解析」研究として承認済みである。

C. 研究結果

- リンパ管内皮細胞に対する増殖抑制効果  
VEGF-C、VEGF-D 500ng/ml存在下で、スニチニブのLECに対する細胞増殖抑制効果を検討した。スニチニブは、0.001 $\mu$ Mの濃度で、増殖抑制作用を示した(図1)。

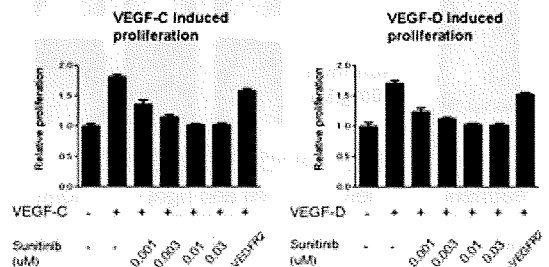


図1. スニチニブのLEC増殖抑制効果

- VEGF-C、VEGFR-3シグナル伝達抑制作用  
VEGF-C刺激下のVEGFR-3のリン酸化、およびその下流因子である、ErK1/2、AKTのリン酸化を、スニチニブは濃度依存的に抑制した(図2)。

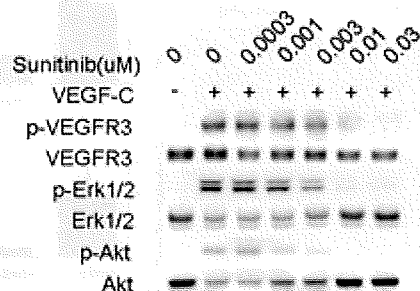


図2. スニチニブのVEGFR-3シグナル伝達抑制作用

・ LEC遊走能、管腔形成に及ぼす影響

スニチニブは、VEGF-C刺激下における、LEC遊走能、管腔形成を抑制した（図3）。

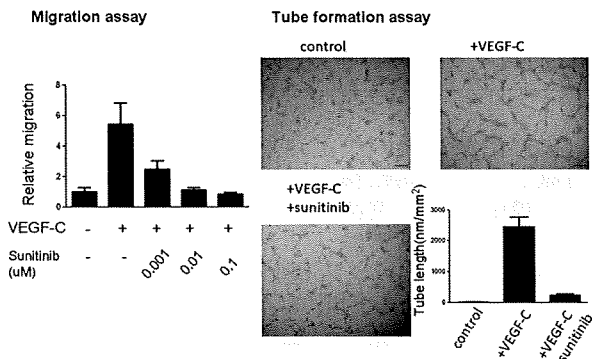


図3. スニチニブのLEC遊走能、管腔形成抑制作用

・ 乳がん細胞同所移植リンパ節転移モデル

MDA-MB-231LN(luciferase)細胞を、SCIDマウスに同所移植した。移植5日後より、スニチニブを2週間経口投与し、リンパ節の転移をIVISシステムにより確認した。スニチニブ投与群は、コントロール群に比較して、有意にリンパ節転移を抑制した（図4）。また、原発巣の腫瘍組織を用いて、CD31抗体により血管の、LYVE-1抗体によりリンパ管の免疫組織化学検査を施行したところ、スニチニブは、血管新生、リンパ管新生ともに抑制することを確認した（図5）。

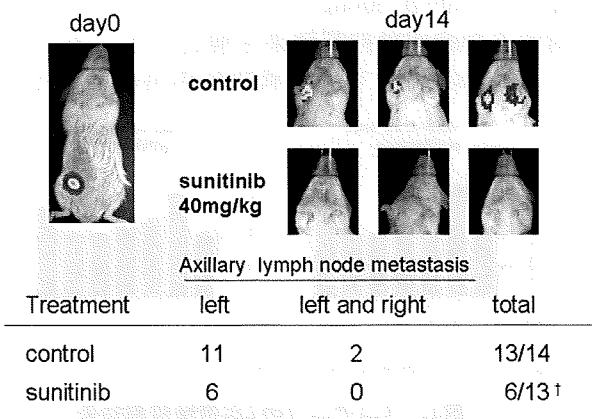


図4. スニチニブのリンパ節転移抑制効果

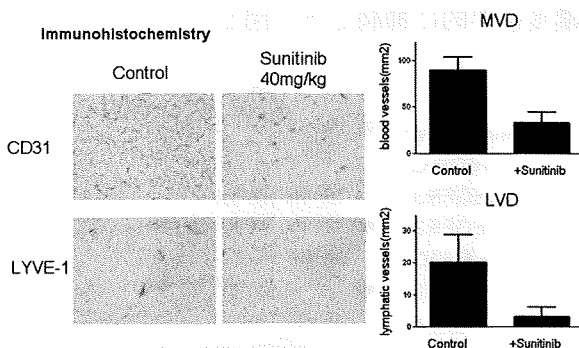


図5. スニチニブの血管新生、リンパ管新生に対する効果

D. 考察

スニチニブは、マルチキナーゼ阻害剤であり、VEGF R-2、KIT、PDGFR等に作用することから、腎臓がん、GISTにおいて承認済みの薬剤である。一方で、VEGFR-3も低濃度から抑制することが知られており、リンパ管新生に対する抑制効果も期待されていた。今回の我々の検討から、スニチニブは、VEGF-C、VEGF-Dを介したVEGFR-3シグナルを抑制し、リンパ節転移を抑制することが示され、腫瘍リンパ管がスニチニブの新たな標的として期待される。上記疾患に加えて、リンパ管形成が豊富な腫瘍に対して有効である可能性が考えられ、今後は、リンパ管新生抑制の観点からスニチニブの有効性を予測するバイオマーカーの探索を進めていきたい。

E. 結論

スニチニブのリンパ管新生に対する効果を検討した。スニチニブは、リンパ管新生に関わるVEGFR-3シグナルの活性を抑制することにより、リンパ管細胞の増殖、遊走、管腔形成を抑制し、マウスモデルにおいて、乳がんのリンパ節転移を抑制することを証明した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

1. 論文発表

- Katanasaka, Y., Ishii, T., Asai, T., Naitou, H., Maeda, N., Koizumi, F., Miyagawa, S., Ohashi, N., Oku, N. Cancer antineovascular therapy with liposome drug delivery systems targeted to BiP/GRP78. Int J Cancer. 2010 in press
- Yamamoto, Y., Kosaka, N., Tanaka, M., Koizumi, F., Kanai, Y., Mizutani, T., Murakami, Y., Kuroda, M., Miyajima, A., Kato, T., Ochiya, T. MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. Biomarkers. 2009 Nov;14(7):529-38.
- Fukui, T., Kodera, Y., Nishio, K., Masuda, N., Tamura, T., Koizumi, F. Synergistic interactions between the synthetic retinoid tamibarotene and glucocorticoids in human myeloma cells. Cancer Sci. 2009 Jun;100(6):1137-43.
- 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): 457-462, 2009.

5. Kawaishi, M., Fujiwara, Y., Fukui, T., Kato, T., Yamada, K., Ohe, Y., Kunitoh, H., Sekine, I., Yamamoto, N., Nokihara, H., Watabe, T., Shimoda, Y., Arao, 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.
6. 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.
7. Yamada, Y., Arao, T., Gotod, 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.

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  
特になし。



分子標的薬を含む薬物治療最適化の基礎研究  
分担研究者 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：

新しいがん薬物治療法の導入と最適化に有用なバイオマーカーの開発を目指して、我々はN-myc下流調節遺伝子(NDRG1)/Cap43、Y-ボックス結合蛋白(YB-1)、さらにEGFR、IGFIRおよびMetなどの増殖関連遺伝子と関与する転写因子群などに注目して研究を進展させている。

A. 研究目的

がん細胞自身とがん間質の両方において、がん薬物療法の導入と最適化に有用なバイオマーカーの探索と新しい治療研究を進展させる。そのために

- (1) がん細胞の増殖や細胞周期を制御する YB-1 や EGFR などの増殖因子受容体とがん治療の感受性を明らかにする。
- (2) がん間質応答を制御することが期待される NDRG1/Cap43 の血管新生やリンパ管新生また腹膜播種への関与の機序を明らかにする。

B. 研究方法

- (1) ヒト乳癌、肺癌、胃癌、膵癌、肝癌患者由来の各々のがん細胞株について各々5株以上培養系で検討した。さらに、これらのうち移植可能な細胞株については、マウス移植のゼノグラフト実験系で腫瘍増大や転移能および治療効果の有無について検討した。
- (2) 培養系がん細胞株さらに担がん動物からの切除腫瘍に関して、増殖や炎症関連因子や他のマーカーについての発現を Western blot, 定量 RT-PCR またマイクロダイセクション法で解析した。
- (3) 癌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病理学者が、バイオ統計については専門家が各々独立に行なった。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や塩期配列法で行なった。
- (4) 血管新生、リンパ管新生、腫瘍増大、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

新しい薬物療法の導入と最適化に有用なバイオマーカーを開発するために、我々はNDRG1/Cap43やYB-1関連遺伝子群、さらにEGFRやMet標的治療薬の新規の耐性関連遺伝子を検討した。その結果、

- (1) がん間質の応答と深く関連する NDRG1/Cap43 が、ヒト膵癌細胞の血管新生因子や CXC ケモカインの生産、またがん増大や血管新生を抑制するが、その抑制に NF- $\kappa$ B シグナルが関与することを発見した。CXC ケモカインの発現誘導への SGK による特定の Thr/Ser 部位のリン酸が必須であることを各々明らかにした。さらに、NDRG1/Cap43 は食道癌では不良因子として、また膵癌や前立腺癌は良好因子となることを報告した。
- (2) 肺癌細胞において YB-1 のノックダウンにより EGFR, HER2, HER3 および Met の発現が低下し、ゲフィチニブやエルロチニブの感受性を低下させた。肺癌患者で HER2 や HER3 の発現が有意に YB-1 の核内局在と関連していた。現在、肺癌細胞の EGFR-標的薬の耐性株の中に PTEN の発現低下が転写レベルで生じているメカニズムについても明らかにしつつある。
- (3) 肺癌患者 (NSCLC) を対象にした免疫組織学的研究の結果から、核内の代表的な酸化ストレス核酸である 8-オキシグアニン (8-oxdG) の発現がゲフィチニブ/エルロチニブ感受性の EGFR 変異と有意に相関することを見出した。他方、YB-1 は細胞周期 G1/S の DNA 複製に必須な CDC6 をはじめとして、G1/S 関連遺伝子群の発現を制御していることをヒト肺癌や乳癌細胞で明らかにした。

D. 考察

- (1) 抗がん剤の治療の最適化と関連して、YB-1 の核内発現が EGFR ファミリー遺伝子の発現に影響を与えることから EGFR 標的薬に対するバイオマーカーの可能性を示した。他方、肺癌における EGFR 標的薬の最適化にむけて、多くの耐性変異株を樹立し、がん抑制遺伝子の新し

い関与や EGFR や Met の細胞内膜輸送タンパク質を同定している。本研究から分子標的薬の感受性や治療効果を予想できる新しいバイオマーカーを提示できると期待している。

- (2) 新しいがん治療の導入に関連して、NDRG1/Cap43 が膵癌においては、血管新生や間質の炎症反応を抑制した。しかし、胃癌や肝癌においては、逆に悪性進展を促進する。NDRG1/Cap43 を標的とした独自のがん治療研究を展開できると期待している。

#### E. 結論

ヒト肺癌患者において、ゲフィチニブ感受性EGFR変異は8-oxodGの発現と有意に相関し、YB-1の核内局在とは逆相関した。さらに、YB-1はヒト乳癌や肺癌細胞の増殖を著明に促進するが、DNA複製に関与するCdc6遺伝子発現を特異的に転写制御していた。ヒト膵癌細胞においてNDRG1/Cap43はCXCケモカインの発現を著明に抑制し、がん血管新生に阻害的に働くことを明らかにした。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

##### 1. 論文発表

- 1) 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. *Clinic. Cancer Res.*, 15 : 1473-1480, 2009.
- 2) Kawahara, A., Akagi, Y., Hattori, S., Mizobe, T., Shirouzu, K., Ono, M., Yanagawa, T., Kuwano, M. and Kage, M. Higher expression of deoxyuridinetriphosphatase (dUTPase) may predict the metastasis potential of colorectal cancer. *J. Clin. Pathology*, 62 : 364-369, 2009.
- 3) 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 IKKbeta expression. *Cancer Res.*, 69 : 4983-4991, 2009.
- 4) Sohda, M., Mochida, Y., Kato, H., Miyazaki, T., Nakajima, M., Fukuchi, M., Manda, R., Fukai, Y., Masuda, N., Ono, M., Kuwano, M., and Kuwano, H. Overexpression of Cap43 is associated with malignant status of esophageal c

ancer. *Anticancer Res.*, 29 : 965-970, 2009.

- 5) Kashiwara, M., Azuma, K., Kawahara, A., Basaki, Y., Hattori, S., Yanagawa, T., Terazaki, Y., Takamori, S., Shirouzu, K., Aizawa, H., Nakao, K., Kage, M., Kuwano, M., Ono, M. Nuclear Y-box binding protein-1 (YB-1) a predictive marker of prognosis, is correlated with expression of HER2/ErbB2 and HER3/ErbB3 in non-small cell lung cancer. *J. Thoracic Oncology*, 4 : 1066-74, 2009.
- 6) Song, Y.S., Oda, Y., Hori, M., Kuroiwa, K., Ono, M., Hosoi, F., Basaki, Y., Kuwano, M., Naito, S., and Tsuneyoshi, M. N-myc downstream regulated gene1 (NDRG1)/Cap43 may play an important role in malignant progression of prostate cancer, in its close association with E-cadherin. *Human Pathol.*, 41 : 214-222, 2010.
- 7) Kidani, A., Izumi, H., Yoshida, Y., Kashiwagi, E., Ohmori, H., Tanaka, T., Kuwano, M., and Kohno, K. Thioredoxin2 enhances the damaged DNA binding activity of mtTFA through direct interaction. *Int. J. Oncol.*, 35: 1435-1440, 2009.
- 10) Basaki, Y., Taniguchi, K., Izumi, H., Kubo, T., Hosoi, F., Watari, K., Nakano, K., Kawaguchi, H., Ohno, S., Kohno, K., Ono, M., and Kuwano, M. Y-box protein-1(YB-1) promotes cell cycle progression through CDC6-dependent pathway in human cancer cells. *Eur. J. Cancer*. in press.

#### H. 知的財産等の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

- ・ 整理番号 QP090164-PC
- ・ 発明の名称 A METHOD OF PREDICTING THE EFFICACY OF A DRUG
- ・ 代表発明者 桑野 信彦特任教授（薬学研究院）
- ・ 出願番号 PCT/JP2010/051304
- ・ 出願日 2010-01-26
- ・ 特許事務所 阿部・井窪・片山法律事務所
- ・ 共同出願人 久留米大学
- ・ 担当者 深見 克哉（知的財産本部）

##### 2. 実用新案登録

##### 3. その他

「抗がん剤の分子標的評価と最適化」に関する研究

分担研究者 掛谷 秀昭 京都大学大学院薬学研究科・教授

研究要旨

膀胱癌をはじめ多くの癌細胞において高発現しているC7orf24遺伝子の発現調節機構を解析した結果、C7orf24遺伝子の転写調節領域を明らかにするとともに、転写因子NF-Yの重要な関与を明らかにし、C7orf24およびNF-Yが癌の分子標的となりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

7番染色体上の推定open reading frameとして見出されたC7orf24遺伝子は、膀胱癌をはじめ多くの癌細胞において高発現しているが、その発現調節機構は不明である。そこで、本研究ではC7orf24遺伝子の発現調節機構を解明する目的で、各種ヒト培養細胞における発現検討、ならびにプロモーター領域の同定を行った。

B. 研究方法

1. 培養ヒト正常細胞株およびヒト癌細胞株におけるC7orf24遺伝子ならびにC7orf24タンパク質の発現量を、それぞれRT-PCR法、ウェスタンブロッティング法により検討した。
2. ヒトC7orf24遺伝子の5' -上流域約2000 baseをPCR法により増幅し、これをレポータープラスミド(pGL-3 basicベクター)にクローニングした。また、様々な鎖長をもつプロモーター領域断片の作製は制限酵素処理またはPCR法で、一塩基置換はPCR法により行った。さらに、リポフェクション法によりHeLa、WI-38等へレポータープラスミドを導入し、各種条件下におけるルシフェラーゼ活性を測定することで、転写調節領域を検討した。
3. ヒトC7orf24遺伝子プロモーター領域における転写因子結合部位の解析については、NF-Yの認識コンセンサス配列であるCCAAT配列をCCAAA配列へと1塩基置換させた変異体レポータープラスミドを作製しレポーターアッセイを行った。

(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株であり、資料提供者の人権・利権については問題ない。

C. 研究結果

1. 半定量的RT-PCRによる解析の結果、ヒト正常二倍体肺線維芽細胞であるWI-38ではC7orf24 mRNAレベルは極めて低レベルであった。一方、検討したすべてのヒト培養癌細胞において、その発現レベルは高

- かった。またmRNAレベルの解析結果と同様に、C7orf24タンパク質の発現は、すべての癌細胞株でWI-38と比較して著しく高いことが明らかとなった。
2. ヒトC7orf24遺伝子の5' -上流域にはTATA boxは存在しなかったが、翻訳開始点より約120 bp上流付近にイニシエーター配列が存在していた。そこでイニシエーター(+1)より上流約2000 bpの領域をレポータープラスミドに挿入し、HeLa細胞等におけるそのプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイにより検討した。その結果、約2000 bpの5' -上流域(-2004~+123)を含むレポータープラスミド導入時には、コントロールと比較してレポーター活性が60倍以上上昇した。さらに絞り込みを行った結果、-371~+123の領域では-2004~+123とほぼ同等のプロモーター活性が認められたが、-165~+123では同活性は大幅に低下し、-34~+123ではほぼ完全に消失した。これらの結果より、ヒトC7orf24遺伝子の-165~-34にプロモーターが存在すること、-371~-165は活性化領域として機能することが明らかとなった。
  3. 転写開始点近傍には、NF-Y結合部位が3ヶ所(-50、-90、-170付近)存在した。そこで、各NF-Y結合部位の重要性について変異を導入したレポータープラスミドによる解析を行った。その結果、C7orf24遺伝子のプロモーター領域に存在する3ヶ所のNF-Y結合部位は、本遺伝子の転写において必須な役割を果たしていることが明らかとなった。

D. 考察

C7orf24 mRNAレベルとタンパク質発現レベルとの間には正の相関があることが明らかとなったことから、C7orf24タンパク質の発現量は転写段階で制御されていることが示唆された。さらに、ヒトC7orf24遺伝子の基礎転写には5' -上流域の-95~-34が重要であること、-370~-95は、それを活性化する領域であること、さらにはヒトC7orf24遺伝子の転写制御には、転写因子NF-Yが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

## E. 結論

C7orf24遺伝子は、酵母よりも高等な生物種に共通に存在している遺伝子であること、各生物種ゲノムには本遺伝子の相同遺伝子は存在しないこと、などから個体におけるその機能の重要性が示唆されている。本研究の結果、ヒトC7orf24遺伝子の転写調節領域を明らかにするとともに転写因子NF-Yの関与を明らかにしたことは、C7orf24およびNF-Yが癌の分子標的となりうる可能性を示した点から意義深い。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

### 1. 論文発表

- 1) 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 fumitremorgen biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *ChemBioChem.*, 10 (5): 920-928, 2009.
- 2) Hayashi, Y., Sankar, K., Ishikawa, H., Nozawa, Y., Mizoue, K., Takeya, H. Total synthesis and determination of the absolute configuration of FD-838, a naturally occurring azaspirobicyclic product. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19 (14): 3863-3865, 2009.

## 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。