

厚生労働省科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業（臨床研究推進研究事業）

バイオイメージング画像による
抗体医薬と低分子化合物分子標的薬剤の
ex vivo評価システムの開発：
末梢血CTC, CEC, CEPおよび
検査または手術新鮮検体を用いて

課題番号：H21-トランスー 一般-012

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

畠 清 彦

（財団法人癌研究会有明病院化学療法科 部長）

平成23(2011)年 3月

厚生労働省科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業（臨床研究推進研究事業）

平成二十二年度 研究報告書 研究代表者：島清彦

目 次

I. 総括研究報告書	
バイオイメージング画像による抗体医薬と低分子化合物分子標的薬剤の ex vivo 評価システムの開発：末梢血 CTC, CEC, CEP および検査または 手術新鮮検体を用いて	島 清彦 5
II. 研究分担報告書	
1. 骨転移症例における bisphosphonate または抗体医薬の評価	高橋 俊二 13
2. 悪性リンパ腫をはじめとする臨床データの提供	照井 康仁 15
3. 前立腺癌、腎臓癌における分子標的薬剤の評価	湯浅 健 19
4. CTC, CEC, CEP を用いた固形がんにおけるバイオマーカー研究	松阪 諭 21
5. 検体からの細胞精製、ADCC 測定、イメージング画像記録	三嶋 雄二 23
6. 手術および病理標本を用いた分子生物学的、免疫学的標的分子の評価	石川 雄一 27
7. 悪性リンパ腫、肺癌における ALK など分子標的の解析	竹内 賢吾 31
III. 研究成果の刊行に関する一覧	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	47

I. 総括研究報告書

バイオイメーキング画像による抗体医薬と低分子化合物分子標的薬剤の *ex vivo* 評価
システムの開発:末梢血 CTC,CEC,CEP および検査または手術新鮮検体を用いて
(H21・トランス一般012)

研究代表者 財団法人癌研究会有明病院化学療法科 部長 畠清彦

研究要旨:

臨床試験により早く導入できるように、比較的まれな標的分子において臨床検体または病理標本において分子疫学調査およびそのための検査方法を開発することを目的とする。バイオイメーキングを用い具体的に測定する方法や FISH など検討して実用化を目指す。CTC または臨床検体の TMA の作成を行う。

A. 研究目的

がん治療の新規薬剤導入の早期実現のための **Critical point** は臨床試験である。製薬企業や基礎研究者が *in vitro*, 動物実験による **preclinical data** から臨床に行くためにも臨床検体を用いた *ex vivo* 研究は重要である。臨床検体を用いた分子標的の評価として、頻度や薬剤に対する効果 **proof of concept** を示す研究などを行いやすい環境が整備できている。標的分子は、ALK (anaplastic large cell lymphoma kinase), pALK, pSTAT3, pERK, pAKT, 膵臓癌において Smad4, RAF/MEK, 肺癌、大腸結腸癌、胃癌、乳癌、血液癌における FGFR, pFGFR, FGFR1,2 & 3, 膵臓癌・乳癌・肺癌・胃癌・骨髄腫における Axl-IL-15R-PAxillin, を検討する。独

創的な点としては、標的分子に対する抗体医薬の開発中のものについては補体依存性障害活性(CDC)、細胞依存性障害活性(ADCC)の両方について検討する。活性測定については独自の測定系を開発して有している。倫理施設内倫理委員会による審査を受け、患者より文書による同意書を得た上で行う。特区で実施される臨床研究の検体を用いてこの研究を実施することによって特区プロジェクト全体での開発を加速化することが出来る。

B. 研究方法

手術検体やリンパ節生検、末梢血標本からの腫瘍細胞を入手し標的分子に関する遺伝子や蛋白の検討する。低分子化合物に効果や抗体医薬の評価系を確立する。癌幹細胞について新鮮時から短期培養、末梢血では、末梢循

環腫瘍細胞、末梢内皮細胞、末梢内皮前駆細胞を分離、薬剤暴露前後に標的分子解析、活性化蛋白などの変化などを検討する。分子疫学調査として、癌関連蛋白質の発現頻度解析、生検・保存検体を用いた免疫組織染色、癌関連変異の頻度解析、生検由来 DNA を用いたシーケンス解析・FISH 解析。

FISH については1個の末梢循環幹細胞からも解析する。バイオマーカー研究として、患者組織を用いたバイオマーカー測定法確立として生検・CTC・肺洗浄液・PBMC 等を用いた遺伝子変異、蛋白質発現等の解析、ex vivo での薬剤応答性評価を目標とする。

(倫理面での配慮)

施設内 IRB にかけて審議し、許可を得て研究している。患者からは同意書を得て検体を提供してもらっている。

C. 研究結果

標的分子は、現在いくつかの企業で標的とされている、ALK (anaplastic large cell lymphoma kinase), pALK, pSTAT3, pERK, pAKT, 膵臓癌において Smad4, RAF/MEK, 種々の癌肺癌、大腸結腸癌、胃癌、乳癌、血液癌における FGFR, pFGFR, FGFR1, 2 & 3, STAT5, 膵臓癌・乳癌・肺癌・胃癌・骨髄腫における Axl-IL-15R-PAxillin を検討した。

CTCにより、直接1個の細胞からFISHでの

解析およびK-RAS変異の解析が可能となるようシステムを作成した。また骨髄腫においても単一細胞でのFISH系も確立した。分子疫学的データが得られた。

ALK については、非小細胞肺癌の3%に認められた。点変異はなく、ファイザー化合物による点変異の耐性機序については現在開発中の薬剤が有効である事がわかった。神経芽細胞腫でも発現過剰している可能性が認められた。

Smad4 の膵臓癌、大腸癌における変異を検出したが、RON についての検査系はまだできていない。

FGFR1~4 については、骨髄腫でのFISH の検出系を確立した。胃癌のCTC、腹水中の細胞などから cancer spheroid を培養した。これについては今後 TMA を行う系を確立しているところである。

AXL については血中可溶性 AXL について測定系 ELISA を決めて、血液、尿検体でのスクリーニングができるかどうかを検討している。胸水、腹水の系では胃癌、大腸癌の予後不良例で非常な高値であった。ADCC の系を作成した。

また CTC を用いた FISH の系を確立した。特許申請中である。

CD20 の点変異についても新たなモノクローナル抗体を作成し、特許申請予定である。

D. 考察

数種類ではあるが、現在開発が考慮されている標的分子の疫学調査が開始された。ALK, AxL, FGFR, RAF, RON, Smad4, については何らかの方法で検出できるようにした。また直接手術検体または胸水、腹水などからの検体からの長期培養を行って Cancer spheroid complex の形成を行った。今後 Tissue Microarray(TMA) を行って多くの標的を一度に調べられるように、作成していく。

E. 結論

標的分子に対する分子疫学調査はきちんと臨床検体を用いて行くと、頻度がわかり開発の方向性の確認が行える。また TMA を用いて今後さらにスピードアップが可能となる

バイオイメージングにより臨床検体が新鮮なまま少量で研究が可能となった。ALK、STAT5 については阻害剤の第 I 相試験が開始された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Matsusaka S, Suenaga M, Mishima Y, Kuniyoshi R, Takagi K, Terui Y, Mizunuma N, Hatake K. Circulating Tumor Cells as Surrogate Marker for Determining Response to Chemotherapy in Japanese Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Sci.* 2011 in press.
- ・ Okanami Y, Ito Y, Watanabe C, Iijima K, Iwase T, Tokudome N, Takahashi S, Hatake K. Incidence of chemotherapy-induced amenorrhea in premenopausal patients with breast cancer following adjuvant anthracycline and taxane. *Breast Cancer.* 2011 in press.
- ・ Maita S, Yuasa T, Tsuchiya N, Mitobe Y, Narita S, Horikawa Y, Hatake K, Fukui I, Kimura S, Maekawa T, Habuchi T. Antitumor effect of sunitinib against skeletal metastatic renal cell carcinoma through inhibition of osteoclast function. *Int J Cancer.* 2011 in press.
- ・ Yuasa T, Urakami S, Yamamoto S, Yonese J, Saito K, Takahashi S, Hatake K, Fukui I. Treatment outcome and prognostic factors in renal cell cancer patients with bone metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2011 in press.
- ・ Matsusaka S, Mishima Y, Hatake K. Circulating endothelial progenitors and CXCR4-positive endothelial cells are predictive marker for bevacizumab. *Cancer.*

2011. in press.
- Yuasa T, Urakami S, Yamamoto S, Yonese J, Nakano K, Kodaira M, Takahashi S, Hatake K, Inamura K, Ishikwa Y, Fukui I. Tumor Size Is a Potential Predictor of Response to Tyrosine Kinase Inhibitors in Renal Cell Cancer. *Urology*. 2011 in press.
 - Mihima Y, Terui Y, Mishima Y, Hatake K. The identification of irreversible rituximab-resistant lymphoma caused by CD20 gene mutations. *Blood Cancer J*, accepted. 2011. in press.
 - Matsusaka S, Suenaga M, Mishima Y, Takagi K, Terui Y, Mizunuma N, Hatake K. Circulating endothelial cells predict for response to bevacizumab-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010 Dec 18. [Epub ahead of print]
 - Ito Y, Nagasaki K, Miki Y, Iwase T, Akiyama F, Matsuura M, Horii R, Makita M, Tokudome N, Ushijima M, Yoshimoto M, Takahashi S, Noda T, Hatake K. Prospective randomized phase II study determines the clinical usefulness of genetic biomarkers for sensitivity to primary chemotherapy with paclitaxel in breast cancer. *Cancer Sci*. Jan;102(1):130-6. 2011
 - Takeuchi K, Yokoyama M, Ishizawa S, Terui Y, Nomura K, Marutsuka K, Nunomura M, Fukushima N, Yagyuu T, Nakamine H, Akiyama F, Hoshi K, Matsue K, Hatake K, Oshimi K. Lymphomatoid gastropathy: a distinct clinicopathologic entity of self-limited pseudomalignant NK-cell proliferation. *Blood*. Dec 16;116(25):5631-7. 2010
 - Ide Y, Ito Y, Takahashi S, Tokudome N, Kobayashi K, Sugihara T, Hattori M, Yokoyama M, Uchiyama A, Inoue K, Sakurai N, Hatake K. Hepatitis B virus reactivation in adjuvant chemotherapy for breast cancer. *Breast Cancer*. 2010 in press.
 - Mitsuhashi J, Hosoyama H, Tsukahara S, Katayama K, Noguchi K, Ito Y, Hatake K, Aiba K, Takahashi S, Sugimoto Y. In vivo expansion of MDR1-transduced cells accompanied by a post-transplantation chemotherapy regimen with mitomycin C and methotrexate. *J*

- Gene Med. 12(7):596-603. 2010
- ・ Ogura M, Tobinai K, Hatake K, Uchida T, Kasai M, Oyama T, Suzuki T, Kobayashi Y, Watanabe T, Azuma T, Mori M, Terui Y, Yokoyama M, Mishima Y, Takahashi S, Ono C, Ohata J Phase I study of inotuzumab ozogamicin (CMC-544) in Japanese patients with follicular lymphoma pretreated with rituximab-based therapy. Cancer Sci. 101(8):1840-5. 2010
 - ・ Yanai H, Nakamura K, Hijioka S, Kamei A, Ikari T, Ishikawa Y, Shinozaki E, Mizunuma N, Hatake K, Miyajima A. Dlk-1, a cell surface antigen on foetal hepatic stem/progenitor cells, is expressed in hepatocellular, colon, pancreas and breast carcinomas at a high frequency. J Biochem. 148(1):85-92.2010
 - ・ Matsusaka S, Chin K, Ogura M, Suenaga M, Shinozaki E, Mishima Y, Terui Y, Mizunuma N, Hatake K. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in patients with advanced gastric cancer. Cancer Sci. 101(4):1067-71. 2010
 - ・ Kobayashi T, Kuroda J, Ashihara E, Oomizu S, Terui Y, Taniyama A, Adachi S, Takagi T, Yamamoto M, Sasaki N, Horiike S, Hatake K, Yamauchi A, Hirashima M, Taniwaki M. Galectin-9 exhibits anti-myeloma activity through JNK and p38 MAP kinase pathways. Leukemia.24(4):843-50. 2010
 - ・ Yuasa T, Maita S, Tsuchiya N, Ma Z, Narita S, Horikawa Y, Yamamoto S, Yonese J, Fukui I, Takahashi S, Hatake K, Habuchi T. Relationship between bone mineral density and androgen-deprivation therapy in Japanese prostate cancer patients. Urology. 75(5):1131-7. 2010
2. 学会発表
なし
- H. 知的財産権の出願・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

II. 研究分担報告書

研究要旨 ビスフォスフォネートまたはその他の骨特異的薬剤の効果を評価するためのバイオマーカーを探索するため、早期乳癌患者における術前ビスフォスフォネート投与を行い、CTC, CEC 等のバイオマーカーとしての可能性が示された。

A. 研究目的

ビスフォスフォネート、デノスマブなどの骨特異的薬剤の開発が進み、骨転移のみならず原発腫瘍／骨外転移に対する効果も示唆されているが、そのメカニズム、効果のバイオマーカーについては明らかになっていない。乳癌骨転移患者あるいは早期乳癌患者におけるビスフォスフォネートまたはその他の骨特異的薬剤の効果を評価するためのバイオマーカーを探索する。

B. 研究方法

1) 早期乳癌で術前化学療法予定の患者に対して化学療法にゾレドロン酸 4mg/3-4w 6ヶ月投与を併用し、病理学的効果を検討すると共に CTC, CEC, DTC(disseminated tumor cells, 骨髄微小転移)等の変化を測定し、治療効果のマーカーになるかを検討する。

2) ビスフォスフォネート以外の新たな骨特異的薬剤の治療効果とそのバイオマーカーを検討する。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言及び GCP の精神に則り実施し、臨床試験に関する倫理指針を遵守する。また患者個人情報に関する倫理指針を遵守する。

C. 研究結果

1) H22 年度において 15 例の早期乳癌患者に対してゾレドロン酸併用の術前化学療法を行い、病理学的効果が明らかになった 9 例中 2 例で Grade 3, 1 例で Grade 2a が得られた。CTC は治療開始前 12 例中 3 例で陽性であったが 3 例とも治療後消失した。

CEC は治療前 108±92 から治療後 496±404 で有意な変動はなかったが、grade 0 または 1a の効果が低い患者では増加する傾向があった。

2) 破骨細胞抑制剤でもある SRC 阻害剤ダサチニブの骨代謝マーカーに対する影響を固形癌患者の第 1 相試験において検討し、骨吸収マーカーである尿 NTx、血清 TRACP-5 が 46.3%、22.2%低下していた。

D. 考察

臨床試験の中間解析であり少数例での検討であるが、化学療法とゾレドロン酸の併用による術前化学療法で高い病理学的効果が得られる可能性がある。また CEC の変動が治療効果のバイオマーカーになる可能性があるが多数例の検討が必要である。

E. 結論

ビスフォスフォネートの骨以外への効果を CEC のようなバイオマーカーにより予測できる可能性がある。今後症例を蓄積し、またその他の骨特異的薬剤についても検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Dana Rathkopf, Glenn Liu, Michael A Carducci, Mario A Eisenberger, Aseem Anand, Michael J Morris, Susan F Slovin, Yasutsuna Sasaki, Shunji Takahashi, Seiichiro Ozono, Nga Kit Eliza Fung, Shinta Cheng, Jinping Gan, Marco Gottardis, Mary T. Obermeier, Jyotsna

Reddy, Steven Zhang, Blisse J. Vakkalagadda, George Wilding, and Howard I. Scher. Phase I Dose-Escalation Studies of BMS-641988 in Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer. Clin Cancer Res 2011 Feb 15;17(4):880-7.

Yoshinori Ito, Koichi Nagasaki, Yoshio Miki, Takuji Iwase, Futoshi Akiyama, Masaaki Matsuura, Rie Horii, Masujiro Makita, Nahomi Tokudome, Masaru Ushijima, Masataka Yoshimoto, Shunji Takahashi, Tetsuo Noda and Kiyohiko Hatake. Prospective randomized phase II study determines the clinical usefulness of genetic biomarkers for sensitivity to primary chemotherapy with paclitaxel in breast cancer. Cancer Science 2011 Jan; 102(1):130-6

Ogura M, Tobinai K, Hatake K, Uchida T, Kasai M, Oyama T, Suzuki T, Kobayashi Y, Watanabe T, Azuma T, Mori M, Terui Y, Yokoyama M, Mishima Y, Takahashi S, Ono C, Ohata J. Phase I study of inotuzumab ozogamicin (CMC-544) in Japanese patients with follicular lymphoma pretreated with rituximab-based therapy. Cancer Sci.

2010 Aug 1;101(8):1840-5. Epub 2010 Apr 23.

Mitsuhashi J, Hosoyama H, Tsukahara S, Katayama K, Noguchi K, Ito Y, Hatake K, Aiba K, Takahashi S, Sugimoto Y. In vivo expansion of MDR1-transduced cells accompanied by a post-transplantation chemotherapy regimen with mitomycin C and methotrexate. J Gene Med. 2010 Jul;12(7):596-60

2. 学会発表

M Miyazaki, S Takahashi, I Okamoto, Y Ito, K Ueda, T Seriu, K Hatake, K Nakagawa. Phase I study of Dasatinib in Japanese patients with advanced solid tumors. 22nd International Congress on anti-cancer treatment, 1-4, Feb. 2011

H. 知的財産権の出願・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

研究課題名 悪性リンパ腫をはじめとする臨床データの提供

研究分担者 財団法人癌研究会 有明病院 血液腫瘍担当部長 照井 康仁

研究要旨 悪性リンパ腫をはじめとする臨床データバンクを構築し、臨床検体を用いた様々な解析と照らし合わせながら、疾患の病態、予後に関する結果に導いた。

A. 研究目的

悪性リンパ腫は年々増加しており、WHO 分類による組織型の多様性が指摘されてきているが、様々な多剤併用療法の開発や新規分指標的薬剤の進歩により、リンパ腫患者の予後は改善されてきた。特に B 細胞表面上にある CD20 抗原に対するマウスヒトキメラ型モノクローナル抗体である rituximab は抗悪性腫瘍薬との併用にて有効な成績が報告されている。しかし日本におけるリンパ腫疾患の病態や予後に迫る報告は数少ない。

本研究の目的は、臨床データバンクを構築し、リンパ節や血液、胸水などの臨床検体のデータを効率的に融合し、日本におけるリンパ腫疾患の病態や予後などの関連性を見いだすことである。

B. 研究方法

2010 年度の血液がん新規患者数 3 4 6 例を対象に臨床データバンクを構築し、リンパ節や血液、胸水などの臨床検体データと融合させた。

研究方法

I. 臨床データバンクの構築

新規患者の年齢、性別、臨床症状、血算と生化学検査などの検査値、病理診断（細胞表面マーカー、遺伝子再構成、染色体異常

を含む）を PC 内に匿名で入力、保存した。

II. 臨床検体データバンクの構築

血液、胸水、リンパ節細胞浮遊液などの臨床検体からリンパ腫細胞を分離し、リツキシマブの感受性試験、CD20 遺伝子変異解析などが施行された。

（倫理面への配慮）

本研究は、Cancer Board の審議を経て調査計画書がまとまった後、Tumor Board に提出する。その後 Scientific Review Board (SRB) にて化学療法専門医による審査が通過された後、Institutional Review Board (IRB) にて弁護士など一般人を含む機関にて本研究の倫理性を審議され承認された上で、研究が開始することになる。

C. 研究結果

I. 臨床データバンク

2010 年度の血液がん新規患者数 3 4 6 例中、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 1 4 2 例と最も多く、次いでろ胞性リンパ腫 4 0 例、MALT リンパ腫 3 4 例であった。一方、T 細胞性リンパ腫は 10% 程度であった。

II. 臨床検体データバンク

血液、胸水、リンパ節細胞浮遊液などの臨床検体からリンパ腫細胞によるリツキシマブの感受性試験では CD20 の発現増強と感受性が正の相関を示した。また CD20 遺伝子変異で、CD20 タンパクの発現低下に関する遺伝子変異がみとめられた。

D. 考察

臨床データベースを構築し、リンパ節や血液、胸水などの臨床検体のデータを効率的に融合を試みた。日本におけるリンパ腫疾患の病態や予後などの関連性を見いだすことにおいて有用であった。

E. 結論

今後、臨床データベースと臨床検体のデータベースを広げることで、様々な解析が可能となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kobayashi T, Kuroda J, Ashihara E, Oomizu S, Terui Y, Taniyama A, Adachi S, Takagi T, Yamamoto M, Sasaki N, Horiike S, Hatake K, Yamauchi A, Hirashima M, Taniwaki M. Galectin-9 exhibits anti-myeloma activity through JNK and p38 MAP kinase pathways. *Leukemia* 24(4):843-50, 2010.
- (2) Matsusaka S, Chin K, Ogura M, Suenaga M, Shinozaki E, Mishima Y, Terui Y, Mizunuma N, Hatake K. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in patients with advanced gastric cancer. *Cancer Sci* 101(4):1067-71, 2010.
- (3) Ogura M, Tobinai K, Hatake K, Uchida T, Kasai M, Oyama T, Suzuki T, Kobayashi

- Y, Watanabe T, Azuma T, Mori M, Terui Y, Yokoyama M, Mishima Y, Takahashi S, Ono C, Ohata J. Phase I study of inotuzumab ozogamicin (CMC-544) in Japanese patients with follicular lymphoma pretreated with rituximab-based therapy. *Cancer Sci.* 101(8):1840-1845, 2010.
- (4) Ueda K, Yokoyama M, Asai H, Koudaira M, Yamada S, Katsube A, Mishima Y, Sakajiri S, Takeuchi K, Saotome T, Terui Y, Takahashi S, Hatake K. Efficacy of CHOP+/-Rituximab-like therapy plus radiation therapy for patients with diffuse large B-cell lymphoma stage I. *Gan To Kagaku Ryoho* 37(5):853-7, 2010.
 - (5) Asai H, Yokoyama M, Terui Y, Ennishi D, Takeuchi K, Hatake K. Is statin use really associated with efficacy of rituximab? *J Clin Oncol* 20;28(24):e424-5; author reply e427-8, 2010.
 - (6) Ohmachi K, Ando K, Ogura M, Uchida T, Itoh K, Kubota N, Ishizawa K, Yamamoto J, Watanabe T, Uike N, Choi I, Terui Y, Usuki K, Nagai H, Uoshima N, Tobinai K; The Japanese Bendamustine Lymphoma Study

Group. Multicenter phase II study of bendamustine for relapsed or refractory indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma. Cancer Sci. 101(9): 2059-64, 2010.

(7) Takeuchi K, Yokoyama M, Ishizawa S, Terui Y, Nomura K, Marutsuka K, Nunomura M, Fukushima N, Yagyuu T, Nakamine H, Akiyama F, Hoshi K, Matsue K, Hatake K, Oshimi K. Lymphomatoid Gastropathy: A Distinct Clinicopathological Entity of

Self-limited

Pseudomalignant NK-cell Proliferation. Blood 116 (25): 5631-5637, 2010.

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・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

研究課題名 前立腺癌、腎臓癌における分子標的薬剤の評価

研究分担者 財団法人癌研究会 有明病院 化学療法科 医長 湯浅 健

研究要旨 転移性腎細胞がんに対する分子標的治療薬スニチニブの効果予測因子について、臨床的側面からおよび *in vitro*, *in vivo* での実験から検討した。スニチニブは *in vitro* の血清濃度では増殖阻害は示さないが、*in vivo* で骨転移増殖阻害を示した。破骨細胞阻害や血管新生阻害などの間接効果が示唆された。臨床症例の後方視的観察では、標的腫瘍と腫瘍縮小率の逆相関を認め、治療前の MSKCC 因子は予後不良の危険因子となることが示唆された

A. 研究目的

転移性腎細胞癌に対する治療アルゴリズムの設立のために、① 分子標的治療薬の効果と副作用に関する因子、② 治療効果に関するバイオマーカーの同定、③ 臨床にて評価が困難な骨転移に関する効果を *in vivo* にて評価することを目的とする。

B. 研究方法

臨床症例からの後方視的観察および腎細胞がん細胞株を用いて *in vitro* および *in vivo* にて解析した。臨床材料を用いる実験では「泌尿器科腫瘍組織での遺伝子異常と発現解析」として IRB に申告し承認を得た。

C. 研究結果、D. 考察、E. 結論

- 1) ヒト腎細胞癌細胞株は、血清濃度レベル(100-200nM)ではスニチニブは直接的な細胞増殖抑制を認めなかった。
- 2) ヒト腎癌細胞株を臨床血清濃度 200nM にて長期間(10 日間)培養し、mirVana miRNA Labeling kit, Isolation kit および Bioarray を用いて臨床血清濃度のスニチニブにより誘導される microRNA の検出を行った。hsa_miR_187 や hsa_miR_194 などの誘導がみられた。
- 3) ACHN^{LUC} 細胞株を樹立し、スニチニブによる腫瘍増殖を抑制を *in vivo* にて確認した($P<0.001$)。骨転移巢の TRAP) 染色

では、スニチニブ投与群で破骨細胞数があきらかに減少していた。

- 4) 分子標的治療が行われた転移性腎細胞癌症例について後方視的に解析を行った。治療前の腫瘍サイズと腫瘍縮小率は負の相関を認め(相関係数 $r=-0.441$, $P<0.0001$)、PS 不良、Hb 低下、血清 LDH 上昇、高 Ca 血症および 1 年以内の腎細胞癌診断から初期全身治療までの期間や、腎摘除歴無しと脳転移が予後不良因子として抽出された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1 Maita S, Yuasa T, et al. Antitumor effect of sunitinib against skeletal metastatic renal cell carcinoma through inhibition of osteoclast function *Int J Cancer (in press)*.
- 2 Yuasa T, et al. Treatment Outcome and Prognostic Factors of the Patients with Renal Cell Cancer Bone Metastasis. *Clin Exp Metastasis (in press)*.
- 3 Yuasa T, et al. Tumor Size is a Potential Predictor of the Response to Tyrosine Kinase Inhibitors in Renal Cell Cancer. *Urology (in press)*.
- 4 Numakura K, Tsuchiya N, Yuasa T, et al. A case study of metastatic Xp11.2 translocation renal cell carcinoma effectively treated with sunitinib. *Int J Clin Oncol (in press)*.

- 5 Tomita Y, Shinohara N, Yuasa T, et al. Overall Survival and Updated Results from a Phase II Study of Sunitinib in Japanese Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2010; 40: 1166-72.
 - 6 Kodaira M, Takahashi S, Takeuchi K, Yuasa T, et al. Erythema multiforme induced by sorafenib for metastatic renal cell carcinoma in Japanese patients. *Ann Oncol*. 2010; 21, 1563-5.
 - 7 Ma Z, Tsuchiya N, Yuasa T et al. Clinical Significance of Polymorphism and Expression of Chromogranin A and Endothelin-1 in Prostate Cancer. *J Urol*. 2010; 184, 1182-8.
 - 8 Yuasa T, et al. Relationship between bone mineral density and androgen-deprivation therapy in Japanese prostate cancer patients. *Urology* 2010; 75, 1131-7.
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
なし。

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業（臨床研究推進研究事業））
分担研究報告書

1. 研究課題名 CTC, CEC, CEP を用いた固形がんにおけるバイオマーカー研究

研究分担者 財団法人癌研究会有明病院化学療法科 医員 松阪 諭

研究要旨 Bevacizumab の効果予測として、免疫磁気ビーズ法を用いた解析にて治療開始前の CEC 値およびフローサイトメトリー法を用いた解析にて、治療開始 4 日目の CEP 値および治療前の CXCR4 陽性 CEC 値が有用であることを明らかにした。

A. 研究目的

大腸癌患者は年々増加してきたが、様々な多剤併用療法の開発や新しい化学療法薬の進歩により、転移・再発大腸癌患者の予後は改善されてきている。特に血管内皮細胞増殖因子(VEGF)に対するキメラ型ヒト化 IgG1 モノクローナル抗体である bevacizumab は抗悪性腫瘍薬との併用にて有効な成績が報告されている。しかし血管新生阻害効果を定量的に評価するバイオマーカーは確立されていない。本研究の目的は、bevacizumab による CEC subpopulation に及ぼす影響を明らかにし、bevacizumab の効果を評価するバイオマーカーを確立することである。

B. 研究方法

進行再発大腸癌症例に対して、標準治療である FOLFOX+Bevacizumab 療法を行った症例に対して、治療開始時（治療開始前 4 週間以内）、1 コース 4 日目（投与終了時）、2 サイクル前、治療効果判定時、治療の変更または終了時に採血した検体を用いて研究する。

研究方法

I. Cell search system による解析

Cell search system は、鉄を結合させた CD146 抗体を末梢血細胞と反応させ、磁気により目的細胞を収集する。コンピュータ

ー上で血管内皮細胞画像（抗 CD105 抗体陽性）と、核画像（DAPI 陽性）を合成することにより、破壊された細胞を識別除外し、形態が保たれた血管内皮細胞のみを選択する。その際、抗 CD45 抗体も反応させ、白血球（CD45 陽性）を除外する。

II. フローサイトメーター法による解析

CEC は、CD31 抗体陽性、CD45 抗体陰性の細胞として分類し、Subpopulation として（VEGFR1, VEGFR2, CXCR4, Tie-2 等）の発現を解析する。CEP は、CD31 抗体陽性、CD133 陽性、CD34 強陽性、CD45 抗体陰性の細胞として分類し測定する。

（倫理面への配慮）

本研究は、Cancer Board の審議を経て調査計画書がまとまった後、Tumor Board に提出する。その後 Scientific Review Board (SRB) にて化学療法専門医による審査が通過された後、Institutional Review Board (IRB) にて弁護士など一般人を含む機関にて本研究の倫理性を審議され承認された上で、研究が開始することになる。

C. 研究結果

I. Cell search system による解析

FOLFOX+Bevacizumab 療法を行い、治療開始前に CEC 値が 65 未満の症例は 65 以上の症例に比べ有意に無増悪生存期間および全生存期間が延長した。（Matsusaka, et al. CCP 2010）

II. フローサイトメーター法による解析
治療開始 4 日目の CEP 低値例および治療前の CXCR4 陽性 CEC 低値例は、無増悪生存期間、全生存期間が有意に延長したことを明らかにした。(Matsusaka, et al. Cancer 2011)

D. 考察

経時的に CEC subpopulation および CEP を検出することで、治療経過中の血管内皮細胞の表現型を評価できることから、Bevacizumab の効果予測に有効なバイオマーカーになると考えられる。

E. 結論

Bevacizumab の効果予測として、免疫磁気ビーズ法を用いた解析にて治療開始前の CEC 値およびフローサイトメトリー法を用いた解析にて、治療開始 4 日目の CEP 値および治療前の CXCR4 陽性 CEC 値が有用であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Matsusaka S, et al. Circulating Endothelial Cells as a Biomarker for Determining Response to Bevacizumab in Metastatic Colorectal Cancer. Cancer Chomether Pharmacol. 2010 Dec 18. [Epub

ahead of print]

Matsusaka S, et al. Circulating Endothelial Progenitors and CXCR4 positive Circulating Endothelial Cells are Predictive Markers for Bevacizumab-containing Chemotherapy in Metastatic Colorectal Cancer. Cancer in press.

2. 学会発表

Matsusaka S, et al. Use of day 4 CEP and baseline CXCR4 plus CEC as predictive markers for bevacizumab in mCRC. ASCO 2010

Matsusaka S, et al. Use of circulating endothelial cells to predict response to FOLFOX4 plus bevacizumab in metastatic colorectal cancer. ASCO-GI 2011

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・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（医療技術実用化総合研究事業（臨床研究推進研究事業））
分担研究報告書

研究課題名：検体からの細胞精製、ADCC測定、イメージング画像記録

研究分担者 （財）癌研究会癌化学療法センター臨床部 研究員 三嶋 雄二

研究要旨 癌研有明病院において同意を得た患者様より提供された新鮮臨床検体より腫瘍細胞にダメージを与えることなく腫瘍細胞を精製し、バイオイメージングにより薬剤感受性試験、バイオマーカーとなる分子の発現、遺伝子変異を解析する。

A. 研究目的

本分担課題は、本研究課題の「バイオイメージングによる ex vivo 評価システムの開発」に向けて、主に抗体医薬の薬効評価系の基盤技術の開発とその技術を応用した評価系を用いて、実際の臨床腫瘍標本を用いた評価系のバリデーションとデータの蓄積を目的とする。

B. 研究方法

（検体処理）臨床検体（切除腫瘍、末梢血、骨髓穿刺生検、内視鏡リンパ節生検、胸水、腹水など）を採取後逐次迅速に処理性、腫瘍生細胞を取得し ex vivo 解析試料を調製する。

(1) 抗体医薬の適応のある腫瘍(B細胞性リンパ腫、乳癌、転移性大腸癌)については、ADCC感受性の評価を実施する。評価により抗体療法に対する耐性例を選出し、作用機序解明にむけた解析に供する。

(2) 大腸癌、胃癌、骨髓腫由来の検体について、腫瘍細胞に発現するがん幹細胞マーカー、新規標的分子候補タンパク質の発現をフローサイトメーター、蛍光イメージングを用いて評価する。評価を行った細胞試料はその一部を spheroid 培養に供し、臨床試料の長期維持と評価(spheroid bank)の構築を目指す。

(3) 消化器系腫瘍由来(胃癌)末梢血標本は、非上皮系細胞の高度な除去を行った後、蛍光イメージングを用いてCTCの同定を行い、CTCにおける遺伝子異常をFISHを組み合わせて解析をする手法を開発する。また本計画により確立した手法を用いて、

胃癌 CTC における Her-2、FGFR-2 の遺伝子異常を解析する。

（倫理面への配慮）

- 1) ヒト検体を対象とする研究の施行にあたっては、ヘルシンキ宣言に則るとともに、施設内倫理委員会に申請し、その承認を得る。
- 2) ヒト検体を採取する際には、被験者個人のプライバシーの保護、検体提供の任意性、提供を受けた検体の取り扱い方、得られる研究成果の医学的貢献度などについて、被験者ないしはその保護者に十分に説明した上で、書面による同意を得る。
- 3) 被験者由来のヒト検体は番号と記号で標識し、被験者の個人情報と検体情報を分離して取り扱う
- 4) 研究の結果は専門雑誌や学術講演会などで公表を予定しているが、その場合、学術的に必要な項目に限定し、被験者の特定につながる情報を公開しない。

C. 研究結果

(1) 抗体医薬 ADCC 活性の評価。B細胞性リンパ腫に対する抗体医薬、rituximab(抗CD20抗体)について、臨床由来検体に対するADCC、CDCの評価を2006年より継続して実施している。また臨床試料の保存検体に対しても本評価を応用し、rituximab抵抗性腫瘍のスクリーニングを実施した。さらに rituximab 抵抗性機序の解明のため、CD20分子のN末端領域を認識するモノクローナル抗体を作成し、rituximab 抵抗性遺伝子変異を容易にスクリーニングできる系を開発した。本スクリーニング系は、上

述の ADCC/CCDC 評価により同定した耐性症例における臨床試料を用いてバリデーション研究を実施した。(関連特許 1 件、関連論文 1 報)

(2) 臨床腫瘍細胞を用に対するバイオマーカー探索。 平成 22 年度は大腸癌 18 症例(手術検体 7 例、胸水 or 腹水 11 例) 胃癌 16 症例(胸水 or 腹水 16 例) 骨髄腫 4 症例(骨髄生検 3 例、胸水 1 例) についてバイオマーカー探索のためタンパク質発現解析を実施した。

・大腸癌では、EGFR+例が 5/14 例(14 例中 15 例)、CD133+細胞が 20%を超える腫瘍が 5/14 例、Axl の発現がある症例が、7/15 例、FGFR2 の発現がある細胞が 1/14 例であった。

・胃癌においては CD133+細胞が 20%を超える腫瘍が 5/16 例、EGFR 陽性例が 13/16 例。AXL 陽性例が 6/16 例、FGFR2 陽性例が 5/16 例、Her2 陽性例が 2/16 例であった。

・骨髄腫における FGFR3 陽性例は、4 例中 2 例であった。

これらの評価データは然るべき評価期間を経過した後、臨床情報との照会と関係性の評価を実施する予定である。

(3) 胃癌患者 CTC での遺伝子異常の解析手法の構築と評価 遺伝子異常解析の有用な評価手法として FISH (fluorescent in situ hybridization)法が用いられるが、腫瘍の存在率の極端に少ない末梢血中の CTC などと同手法で評価することは困難である。そこで、末梢血中の CTC を相対的に濃縮し免疫学的方法(IHC)を施すことで CTC を識別し、さらに IHC で標識された細胞をそのまま FISH を施すことで、CTC の遺伝解析を可能にするプロコールを作成した。ほんプロコールでは、サイトケラチン陽性、CD45 陰性の有核細胞を CTC と定義し、これらの細胞を抗汎サイトケラチン抗体、抗 CD45 抗体、および DAPI による IHC を実施し、さらに Her-2 (+CDP17)および FGFR2 (+CEP10)の 2-color FISH をそれぞれ実施し、共焦点レーザー走査型顕微鏡の疑似多重チャンネル機能を用いることで 5 チャンネル蛍光イメージを 3 次的に評

価する方法を採用した(関連特許 1 件)。本プロコールにより本年度は 例の胃癌症例について Her-2、FGFR-2 の遺伝子解析を実施、データを蓄積した。解析件数は末梢血(CTC)28 症例、胸腹水 17 症例、内視鏡生検 3 例であった。

D. 考察

本年度は臨床検体の採取、匿名化、精製、解析、培養、保存に関する一連の処理工程の本格的な運用を開始し、ベッドサイドから実験室での検体と情報のスムーズな連携が可能であることを確認し、細胞の分画精製の迅速性、精度の改善、イメージングを利用した新規解析手法の導入を達成した。本年度の本分担研究課題は、実臨床の検体より取得できる症例ごとの固有のデータの蓄積を行うことが優先課題であり、血液腫瘍、消化器腫瘍、乳癌などの症例で総計 100 症例を超える検体の処理と解析を実施した。また、将来的な運用を企図した spheroid bank の維持、拡充を継続している。

E. 結論

本研究課題で取得した個々の解析データは、検体を提供していただいた症例の臨床情報と照会することで多くの臨床上有用な知見を提供するものである。次年度以降も解析データの収集蓄積を継続しつつ、充分な臨床情報の収集後、他の分担研究課題と協調して統計的な解析を行うことを計画している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

The identification of irreversible rituximab-resistant lymphoma caused by CD20 gene mutations.

Mishima Y, et al. Blood Cancer Journal (in press)

2. 学会発表

○日本癌学会総会 ポスター

69th Annual meeting of the