

「抗癌薬の有害事象・効果関連分子の解明と臨床応用を目指した研究

研究分担者 小泉 史明 国立がん研究センター

研究要旨

EGFR-TKI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、2004年から2009年度までに当院の肺内科データベースに登録されている非小細胞肺癌で、EGFR-TKIによる治療が行われた患者のDNAを用いて疾患-対照関連解析を行った。ILDの診断は、2人の肺内科医が独立して行い、診断に相違が生じた場合は話し合いにて決定した。1st stepとして、ILD群12例、対照群54例の遺伝子多型を検討した。アッセイ方法として、候補遺伝子アプローチをおこない、ABCB1のrs28364274 (coding, p=0.00061, uncorrected)が抽出された。また当施設のデータベースから作成した連鎖不平衡マップから、ABCB4が候補遺伝子として抽出された。2nd Stepとして、当院で行われている別のGWASプロジェクトにより遺伝子多型解析が終了し、EGFR-TKIの内服歴のある症例から、ILD群2例、対照群275例を選び、さらに東病院の7例のILD群を追加して上記SNPを検証した。追加解析によりp値は上昇したが、不適格と判定された症例において、ILDの発症が否定できないものも確認された。rs28364274は、3.17%の頻度で認められ、他人種においては極めて稀な日本人に多い多型であった。

A. 研究目的

EGFR-TKI (EGFR-tyrosine kinase inhibitor) 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が特徴として挙げられる。本肺障害が、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」という仮説のもとに症例-対象関連解析をおこなっている。本研究目的は、EGFR-TKIによる薬剤性肺障害の発症に関わる原因遺伝子の多型を見出し、臨床応用することである。

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。遺伝子リストを表1に示す。

表1. 候補遺伝子リスト (赤字はILDとの関連が報告されているもの)

EGFR	ABCA2	ABCC3	SLC21A11 (SLC03A1)	CLDN4	<u>IL1RN</u>
SFTPA1	<u>ABCA3</u>	ABCC4	SLC21A12 (SLC04A1)	CLDN5	<u>TNFA</u>
<u>SFTPA1B</u>	ABCA4	ABCC5	SLC22A1 (OCT1)	CLDN7	TNFRSF1A
<u>SFTPA2</u>	ABCA5	ABCC6	SLC22A2 (OCT2)	CLDN8	TNFRSF1B
<u>SFTPA2B</u>	ABCA5	ABCC7	SLC22A3 (OCT3)	CLDN18	CCL2 (MCP-1)
<u>SFTPB</u>	ABCA6	ABCC10	SLC22A4 (OCTN1)	TJP1	CCL5 (RANTES)
<u>SFTPC</u>	ABCA7	ABCD1	SLC22A5 (OCTN2)	OCLN	CCL13
SFTPD	ABCA8	ABCD2	SLC28A1 (CNT1)	TLR1	CCL18
TTF1	ABCA9	ABCD3	SLC28A3 (CNT3)	TLR2	CXCL1
CYP1A1	ABCA10	ABCD4	SLC29A2 (ENT2)	TLR3	CXCL10
CYP1A2	ABCA12	ABCF1	SLC34A2	TLR4	CCR1
CYP1B1	<u>ABCB1</u>	ABCF2	SLC44A1 (CTL1)	TLR5	CCR2
CYP2C9	ABCB2	ABCF3	SLC44A2 (CTL2)	ICAM1	CCR3
CYP2C19	ABCB3	ABCG1	SLC44A3 (CTL3)	CD80	CCR3
CYP2D6	ABCB4	<u>ABCG2</u>	SLC44A4 (CTL4)	CD83	CCR5
CYP2F1	ABCB7	SLC5A7 (CHT1)	SLC44A5 (CTL5)	CD86	CCR5
CYP3A4	ABCB8	SLC6A4	LPCAT1	TNFAIP3	CISH
CYP4B1	ABCC1	SLC11A1	CLDN1	IRAK2	SOCS1
ABCA1	ABCC2	SLC15A3	CLDN3	IRAK3	SOCS3

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解析し、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した。疾患群：EGFR-TKI投与を受け急性肺障害を発症した症例。

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

疾患群と対照群の判別は、2名の呼吸器専門医が独立しておこない、判定が不一致の際は話し合いにより最終決定した。

伝子タイピング

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を中心に、EGFR-TKIの薬理作用を

・ 1st Step (昨年度まで)

疾患群12例、対照群53例において候補遺伝子のタイピングをおこない、関連解析をおこなった。

・ 2nd Step (本年度)

遺 1st Stepで抽出された遺伝子多型が別プロジェクトによりすでに解析済みで、EGFR-TKIの内服歴のある症例335例を抽出。疾患群、対照群、不適格群に分類し、さらに国立がん研究センター東病院のILD7例を追加して検証した。

(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

1st Stepでは、EGFR-TKIが基質としてはたらく、ABCトランスポーターの一つであるABC1 (P-glycoprotein) の多型が抽出された (rs28364274 (coding, p=0.00061, uncorrected))。rs28364274について、2nd Stepの疾患群10例、対照群275例について検証したところ、本SNPは疾患群10例のいずれにも見いだされなかった。1st Stepと2nd Stepを合わせた解析を表2に示す。

rs28364274のA/Gのアレル頻度は他人種においては極めてまれである(表3)が、本解析では3.17%の頻度で認められ、日本人に多型と考えられた。

表2. rs28364274のアレル頻度

A / G	AA+AG	GG	Total
ILD	4	18	22
Control	6	322	328
Total	10	340	350

p=0.0019, Fisher's exact test, uncorrected

表3. rs28364274の人種差に関する報告

Population Diversity									
ss#	Sample Ascertainment				Genotype Detail			Alleles	
	Population	Individual Group	Chrom. Sample Cnt.	Source	A/G	G/G	HWP	A	G
rs35072312	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	

D. 考察

EGFR-TKI投与による肺障害は致死率が高い。臨床上の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。今回我々が見出したABC1 (P-glycoprotein) は、gefitinibが基質として作用し、その機能を阻害することが既に報告されている。gefitinibにより、機能が阻害されILDの発症のトリガーとなる可能性は否定できない。

2nd Stepにおける解析では、不適格と判定された症例の中にも、ILDの発症が否定できない症例も含まれている。今後は本SNPの機能解析を進め、ILD発症との関連を検討したい。

E. 結論

本研究により、EGFR-TKIによる肺障害に関連する遺伝子多型としてABC1 (P-glycoprotein) のr28736474が抽出された。追加解析の疾患群において、同SNPは検出されなかったが、機能、人種差、不適格症例の状況などから、本SNPと肺障害の関連は否定できないと考えられ、今後も機能解析を中心に研究を進めていきたい。

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)

H. 論文発表

1. Yamada K, Yamamoto N, Yamada Y, Nokihara H, Fujiwara Y, Hirata T, Koizumi F, Nishio K, Oyama N, Tamura T. Phase I Dose Escalation Study and Biomarker Analysis of E7080 in Patients with Advanced Solid Tumors. Clin Cancer Res. 2011 Mar 3. [Epub ahead of print]
2. Tamura K, Shimizu C, Hojo T, Akashi-Tanaka S, Kinoshita T, Yonemori K, Kouno T, Katsumata N, Ando M, Aogi K, Koizumi F, Nishio K, Fujiwara Y. Fc{gamma}R2A and 3A polymorphisms predict clinical outcome of trastuzumab in both neoadjuvant and metastatic settings in patients with HER2-positive breast cancer. Anncol. 2010 Nov 25. [Epub ahead of print]
3. Taguchi F, Kodera Y, Katanasaka Y, Yanagihara K, Tamura T, Koizumi F. Efficacy of RAD001 (everolimus) against advanced gastric cancer with peritoneal dissemination. Invest New Drugs. 2010 Jun 8. [Epub ahead of print]

I. 知的財産等の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

薬剤性肺障害の発症のリスク予測、該リスク予測のための遺伝子の検出方法及び検出用キット (出願

番号2010-130992)

2. 実用新案登録
特になし

3. その他
特になし

がん薬物治療最適化と創薬に有用なバイオマーカーの探索研究

研究分担者 桑野 信彦 九州大学大学院薬学研究院 臨床薬学講座 ・ 特任教授

研究要旨

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開発を目指している。我々は肺癌治療分子標的薬に対する耐性獲得の機序としてPTEN-Egr-1の関与を、胃癌に対するハーセプチン治療の効果にYB-1-HER2の関与を各々明らかにしつつある。さらにはがん血管新生の新しい抑制薬の創薬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) がん細胞の増殖因子受容体EGFRやHER2/ErbB2 また関連する転写因子YB-1などを対象に分子標的薬の適正化に有用なメカニズムとバイオマーカーを明らかにする。
- (2) がん間質に炎症反応と関連して誘導される血管新生のがんの増大と転移/浸潤への関与メカニズムとバイオマーカーを明らかにし、新しい血管新生抑制治療研究を進展させる。

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、ゼノグラフト動物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 *in vivo* で検討した。
- (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 や、定量 RT-PCR 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。EGFR 活性変異体を認識する抗体については Cell Signaling 社のものを使用した。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基配列法で行なった。
- (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

薬物療法の最適化に関しては、肺癌及び胃癌を中心として、さらに新しい薬物療法導入に関しては、がん間質における血管新生やリンパ管新生を対象とした血管新生抑制薬の検討を行った。本年度は、

- (1) 肺癌 (NSCLC) 患者を対象としたイレッサ/エルロチニブ感受性と関連する活性化EGFR変異の存在の有無を2つの変異EGFRを特異的に認識する抗体を用いた免疫組織染色 (IHC) 法で行った。その結果は塩基配列による結果とほぼ同じ精度で検出できた。
- (2) 肺癌において、ゲフィチニブやエルロチニブ耐性の獲得の新しい機序を把握するために、活性化EGFR変異を持つ肺癌細胞から耐性株を突然変異剤を使用せずに2株独立に単離した。耐性株においては、PTEN発現の消失とリン酸化AKT発現亢進と転写因子Egr-1の核内発現が減少していた。
- (3) HER2/ErbB2の発現を制御するY-ボックス結合蛋白-1 (YB-1) に注目し、ヒト胃癌細胞株でYB-1 siRNAで同遺伝子の発現を減少させたところ、特異的にHER2の発現とCDC6の発現を抑制した。
- (4) 新しい血管新生抑制薬の開発研究に関して、炎症性サイトカインによって誘導されるICAM-1生産を阻害する天然物由来化合物誘導体が、VEGF及びIL-1誘導の血管新生を著明に抑制し、VEGF受容体のリン酸化を阻害することを見出した。

D. 考察

薬物療法の適正化に関して、肺癌のEGFR活性化変異の検出に、IHC分析を塩基配列と並行して進めることは有用ではないかと考えられる。またゲフィチニブ/エルロチニブ耐性獲得にPTEN-AKT活性化は重要であるが、PTEN発現の制御メカニズムのうち、Egr-1の核内

発現の低下が薬剤抵抗性肺癌患者においてどれだけの臨床的意義を持つかは今後の課題である。さらに、HER2標的のハーセプチンは乳癌や胃癌に臨床応用されているが、HER2発現制御へのYB-1の関与を明らかにすることは大切と考えている。他方、新しいがん治療の導入に関して、VEGF誘導の血管新生だけでなく、炎症性サイトカイン誘導の血管新生を抑制する新しいタイプの血管新生阻害剤について抗腫瘍効果を明らかにすることが大切と考えている。

E. 結論

- (1) ヒト肺癌細胞においてPTEN発現とPTENの転写制御因子Egr-1の核内発現消失がエルロチニブ/ゲフィチニブ耐性の獲得に関与していた。
- (2) ヒト乳癌や肺癌細胞においてYB-1はHER2の発現を制御し、癌組織においてYB-1の核内発現がHER2発現と有意に関連していた。
- (3) 炎症性サイトカインのシグナルを阻害する天然化合物の中からVEGFとIL-1誘導の血管新生を著明に抑制する薬剤を見出した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto, C., Basaki, Y., Kawahara, A., Nakashima, K., Kage, M., Izumi, H., Kohno, K., Uramoto, H., Yasumoto, K., Kuwano, M., and Ono, M. Loss of PTEN expression by blocking nuclear translocation of EGR1 in gefitinib-resistant lung cancer cells harboring EGFR activating mutation. *Cancer Res.*, 70 : 8715-25, 2010.
2. Kawahara, A., Yamamoto, C., Nakashima, K., Azuma, K., Hattori, A., Kashihara, M., Aizawa, H., Basaki, Y., Kuwano, M., Kage, M., Mitsudomi, T., and Ono, M. Molecular diagnosis of activating EGFR mutations in non-small cell lung cancer using mutation-specific antibodies for immunohistochemical analysis. *Clin. Cancer Res.*, 16 : 3163-170, 2010.
3. Kawahara, A., Azuma, K., Hattori, S., Nakashima, K., Basaki, Y., Akiba, J., Takamori, S., Aizawa, H., Yanagawa, T., Izumi, H., Kohno, K., Kono, S., Kage, M., Kuwano, M., and Ono, M. The close correlation between 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and epidermal growth factor receptor activating mutation in non-small cell lung cancer. *Human Pathol.*, 41 : 951-59, 2010.
4. Basaki, Y., Taniguchi, K., Izumi, H., Murakami, Y., Kubo, T., Hosoi, F., Watari, K., Nakanishi, 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.*, 46 : 954-65, 2010.
5. Hirano, G., Izumi, H., Kidani, A., Yasuniwa, Y., Han, B., Kusaba, H., Akashi, K., Kuwano, M., and Kohno, K. Enhanced expression of PCAF endows apoptosis resistance in cisplatin-resistant cells. *Mol. Cancer Res.*, 8 : 864-72, 2010.
6. Kawahara, A., Hattori, S., Akiba, J., Nakashima, K., Taira, T., Watari, K., Hosoi, F., Uba, M., Basaki, Y., Koufujii, K., Shirouzu, K., Akiyama, S., Kuwano, M., Kage, M., and Ono, M. Infiltration of thymidine phosphorylase-positive macrophages is closely associated with tumor angiogenesis and survival in intestinal type gastric cancer. *Oncology Rep.*, 24 : 405-15, 2010.
7. Matsugaki, T., Zenmyo, M., Hiraoka, K., Fukushima, N., Shoda, T., Komiya, S., Ono, M., Kuwano, M., and Nagata, K. N-myc downstream-regulated gene 1/Cap43 expression promotes cell differentiation of human osteosarcoma cells. *Oncology Rep.*, 24 : 721-25, 2011.
8. Murakami, Y., Hosoi, F., Izumi, H., Maruyama, Y., Ureshino, H., Watari, K., Kohno, K., Kuwano, M., and Ono, M. Identification of sites subjected to serine/threonine phosphorylation by SGK1 affecting N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1)/Cap43-dependent suppression of angiogenic CXC chemokine expression in human pancreatic cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 396 : 376-81, 2010.
9. Song, YS., Oda, Y., Hori, M., Kuroiwa, K., Ono, M., Hosoi, F., Basaki, Y., Tokunaga, S., Kuwano, M., Naito, S., and Tsuneyoshi, M. N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1)/Cap43 may play an important role in malignant progression of prostate cancer, in its close association with E-cadherin. *Human Pathol.*, 41:214-22, 2010.
10. Uramoto, H., Shimokawa, H., Hanagiri, T., Kuwano, M., and Ono, M. Expression of selected gene for acquired drug resistance to EGFR-TKI in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer.*, in press, 2011.

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

「抗がん剤の分子標的評価と最適化」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

低酸素誘導因子(HIF)は、固形腫瘍内などの低酸素環境に曝されている組織・細胞において特異的に活性化される転写因子の1つであるが、HIF活性化を抑制する化合物としてアンサマイシン系化合物cytotrienin A(サイトトリエンA)を見出し、cytotrienin Aの培養細胞レベルにおけるHIFの活性化ならびに血管新生に与える影響を検討した。

A. 研究目的

低酸素誘導因子(hypoxia-inducible factor; HIF)は固形腫瘍内などの低酸素環境に曝されている組織・細胞において特異的に活性化される転写因子であり、その標的遺伝子の活性化を介して、腫瘍細胞の生存や悪性化に深く関与している。そこで、HIFを分子標的とした抗がん剤リード化合物の開発を目指し、探索研究・薬活性評価を行った。

B. 研究方法

1. HIF-1/2 標的遺伝子の1つであるヒト血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)のプロモーター上に存在するHIF-1/2結合配列(Hypoxia Responsive Element; HRE)をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したレポータープラスミドをヒト線維肉腫細胞株 HT1080 に導入した安定発現細胞株x5HRE/HT1080 細胞を利用して、HIF制御物質のスクリーニングを行った。
2. 培養細胞レベルにおけるVEGFタンパク質分泌の検討は、試験薬剤を様々な条件下に処理後、ELISA法を用いて行った。
3. 培養細胞レベルにおけるHIF-1 α のタンパク質、mRNAの発現量は、それぞれウェスタンブロッティング法、RT-PCR法により検出した。
4. ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVECs)の遊走評価に関しては、3次元培養系を用いて行った。また、ニワトリ受精卵胚漿膜法(Chick Choriallantoic membranes assay: CAM assay)を用いて、in vivo 血管新生に対する試験薬剤の効果を検討した。

(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. x5HRE/HT1080細胞を用いて、HIF活性化を抑制する

化合物の探索研究を行った結果、放線菌ストレプトミセス属が産生するアンサマイシン系アポトーシス誘導物質cytotrienin Aが低酸素条件下において、HIF活性化を顕著に抑制することを見出した。

2. 低酸素条件下(酸素濃度: 1%)、ヒト乳がん細胞MCF-7細胞において分泌されるVEGFタンパク質への影響を検討した結果、cytotrienin AはVEGFタンパク質の細胞外への分泌を濃度依存的に抑制した。そこで、HIF-1 α の発現に与える影響を検討したところ、cytotrienin Aは低酸素によって誘導されるHIF-1 α タンパク質の発現・蓄積を同様に抑制した。この時、cytotrienin Aは、HIF-1 α のmRNA発現量は抑制しなかった。
3. Cytotrienin Aは、MCF-7細胞において、塩化コバルト処理(擬似低酸素条件)によって誘導されるHIF-1 α タンパク質の発現も濃度依存的に抑制した。
4. VEGFによって誘導されるヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVECs)の遊走に与えるcytotrienin Aの影響に関して、3次元培養系を用いて検討した結果、cytotrienin AはHUVECsの遊走を細胞毒性に影響を与えない濃度域において顕著に抑制した。さらに、ニワトリ受精卵胚漿膜を用いたCAM assayにおける血管新生をcytotrienin Aは顕著に阻害した。

D. 考察

アンサマイシン系化合物cytotrienin Aが低酸素におけるHIF活性化を顕著に抑制したことから、活性発現に分子内のhydroquinone骨格が関与している可能性が示唆された。また、cytotrienin Aは培養細胞レベルにおいて、HIF-1 α のmRNA発現量を抑制することなく、HIF-1 α タンパク質発現抑制効果を示したことから、低酸素環境下において翻訳機構に影響を与えることが示唆された。

E. 結論

HIFは固形腫瘍内などの低酸素環境に曝されている組織・細胞において特異的に活性化される転写因子の1つであり、cytotrienin Aは培養細胞レベルにおい

てHIF活性化を抑制することで、抗血管新生作用を有することが明らかになった。さらには、cytotrienin Aは、in vivoモデル実験系(CAM assay)においても顕著な血管新生抑制効果を示したことから、抗がん剤のリード化合物として期待される。

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) Lindqvist, L., Robert, F., Merrick, W., Takeya, H., Fraser, C., Osada, H., Pelletier, J. Inhibition of translation by cytotrienin A - a member of the ansamycin family. RNA, 16(12): 2404-2413, 2010.
- 2) Nishimura, S., Arita, Y., Honda, M., Iwamoto, K., Matsuyama, A., Shirai, A., Kawasaki, H., Takeya, H., Kobayashi, T., Matsunaga, S., Yoshida, M. Marine antifungal theonellamides target 3rd-hydroxysterol to activate Rho1 signaling. Nat. Chem. Biol. 6(7): 519-526, 2010.
- 3) Takeya, H., Nishimura, S. Novel natural products open the door of chemical biology and medicinal chemistry. J. Synth. Org. Chem. Jpn. 68(5): 490-500, 2010.

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

ABCB5は、P-gpと同じfamilyに属するABC輸送体である。本研究により、ABCB5発現細胞がdocetaxel、paclitaxelなどの抗がん剤に弱い耐性を示すこと、ABCB5発現細胞のdocetaxel耐性がverapamil、quinidineなどにより阻害されること、ABCB5がvanadate-sensitive ATPase activityを持つことが示された。

A. 研究目的

我々は、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-糖タンパク質（P-gp、ABCB1）によく似た構造のABC輸送体であることを明らかにした。本研究では、ヒトABCB5の基質および阻害剤を検索する。また、ABCB5のATPase活性について調べる。

B. 研究方法

ヒトの全長ABCB5 cDNAのN末側にc-Myc-tagを付けたMyc-ABCB5 cDNAを作成した。このcDNAをCAGプロモーターとZeocin耐性遺伝子を持つ発現ベクターであるpCAL-IRES-ZEOに組み込み、ヒト胎児腎由来HEK293細胞に導入した。Zeocinで選択して得られた細胞を限界希釈法によりクローニングし、ABCB5高発現クローン293/B5-11、293/B5-8を得た。Myc-ABCB5の発現は、抗c-Myc抗体を用いたWestern blotにより検出した。ABCB5高発現クローンの抗がん剤感受性は、細胞増殖阻害試験により検討した。

Myc-ABCB5 cDNAをbaculovirus transfer vectorであるpBacPAC9に組み込み、バキュロウイルスゲノムとの相同組換えにより組換えバキュロウイルスを作成した。これを昆虫細胞Sf21に導入して得たABCB5高発現細胞より、細胞膜ベシクルを調製した。比較対象として、P-gp、BCRP（ABCG2）のそれぞれの組換えバキュロウイルスを作成し、これをSf21に導入して細胞膜ベシクルを調製し、実験に用いた。それぞれの細胞膜面分のATPase活性を測定した。

（倫理面への配慮）

C. 研究結果

ABCB5高発現細胞である293/B5-11は、docetaxel、paclitaxelに2.5〜3倍の耐性を示した。また、doxorubicin、daunorubicin、actinomycin D、vincristineにも弱い耐性を示した。一方、293/B5-11は、mitoxantrone、etoposide、SN-38、topotecan、colchicine、methotrexate、cisplatin、ara-C、5-FU、6-MPには耐

性を示さなかった。verapamil、quinidine、trifluop

erazine、terfenazine、amiodarone、dipyridamole、reserpine、FK506、ritonavir、gefitinib、imatinib、cepharanthine、MS-209は、293/B5-11のdocetaxel耐性を低下させた。一方、cefoperazone、phenytoin、erythromycin、progesterone、aldosterone、hydrocortizoneは、293/B5-11のdocetaxel耐性に影響を与えなかった。もうひとつのABCB5高発現細胞である293/B5-8でもほぼ同様の結果が得られた。293/B5-11、293/B5-8における内因性のP-gpの発現量は親株のHEK293と全く同じであった。

Sf21、ABCB5、P-gpのそれぞれの細胞膜ベシクルのvanadate-sensitive ATPase activityのVmaxは、21、65、52 nmol/min/mg proteinであった。また、それぞれのKmは、1.6、1.8、1.5 mMであった。以上より、ABCB5はP-gpと同様の、vanadateで阻害されるATPase活性を持つことが示された。

D. 考察

ABCB5高発現細胞は、docetaxel、paclitaxelに2.5〜3倍の耐性を示した。また、doxorubicin、actinomycin D、vincristineなどのP-gpの基質として知られている抗がん剤にも弱い耐性を示した。ABCB5高発現細胞のdocetaxel耐性は、verapamil、quinidine、FK506、ritonavirなど、P-gpを阻害することが知られている種々の薬物で阻害された。こうした結果は、ABCB5が、P-gpの多くの基質に弱いaffinityを持つことを示している。

バキュロウイルス発現系により、ABCB5が、P-gpとほぼ同様のvanadate-sensitive ATPase activityを持つことが示された。今後、再構成膜ベシクルを用いてABCB5のATPase活性を検討する予定である。

E. 結論

ABCB5は、P-gpとよく似た構造のABC輸送体である。本研究により、ABCB5発現細胞がdocetaxel、paclitaxelなどの抗がん剤に弱い耐性を示すこと、ABCB5発現細胞のdocetaxel耐性がverapamil、quinidineなどに

より阻害されること、ABCB5がvanadate-sensitive ATPase activityを持つことが示された。

F. 健康危険情報

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 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. Usuda, J., Tsunoda, Y., Ichinose, S., Ishizumi, T., Ohtani, K., Maehara, S., Ono, S., Tsutsui, H., Ohira, T., Okunaka, T., Furukawa, K., Sugimoto, Y., Kato, H., Ikeda, N. Breast cancer resistance protein (BCRP) is a molecular determinant of the outcome of photodynamic therapy (PDT) for centrally located early lung cancer. *Lung Cancer* 67(2): 198-204, 2010.
2. Kawahara, H., Noguchi, K., Katayama, K., Mitsuhashi, J., Sugimoto, Y. Pharmacological interaction with sunitinib is abolished by a germ line mutation (1291T>C) of *BCRP/ABCG2* gene. *Cancer Sci*, 101(6): 1493-1500, 2010.
3. Yashiroda, Y., Okamoto, R., Hatsugai, K., Takemoto, Y., Goshima, N., Saito, T., Hamamoto, M., Sugimoto, Y., Osada, H., Seimiya, H., Yoshida, M. A novel yeast cell-based screening identifies flavone as a tankyrase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*, 394(3): 569-573, 2010.
4. Yoshioka, H., Noguchi, K., Katayama, K., Mitsuhashi, J., Yamagoe, S., Fujimuro, M., Sugimoto, Y. Functional availability of gamma-herpesvirus K-cyclin is regulated by cellular CDK6 and p16INK4a. *Biochem Biophys Res Commun*, 394(4):1000-1005, 2010.
5. Shigeta, J., Katayama, K., Mitsuhashi, J., Noguchi, K., Sugimoto, Y. BCRP/ABCG2 confers anticancer drug resistance without covalent dimerization. *Cancer Sci*, 101(8): 1813-1821, 2010.
6. 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.
7. Hatsugai, K., Ohishi, T., Sugimoto, Y., Seimiya, H. Tankyrase-1 assembly to large protein complexes blocks its telomeric function. *FEBS Lett*, 584(18): 3885-3890, 2010.

H. 知的財産等の出願・登録状況 (予定を含む。)

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 岡本 勇 近畿大学医学部内科学腫瘍内科学部門 准教授

研究要旨

第2世代EGFR-TKIであるBIBW2992はT790Mを持つEGFR-TKI耐性肺癌細胞株において肺癌細胞のThymidylate Synthase (TS)の発現を抑制し、TS標的抗癌剤(S-1, ペメトレキセド)の感受性を上昇させることが示された。これら薬剤の併用療法はEGFR-TKIに対する耐性克服にむけた治療開発のひとつの方向性と考えられる。

A. 研究目的

上皮成長因子受容体(EGFR)チロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKIs)はEGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者に顕著な抗腫瘍効果を呈するが、ほぼ全例において1-2年以内に耐性を獲得しその治療効果が維持出来なくなるのが臨床で大きな問題である。獲得耐性の分子メカニズムとして、EGFR遺伝子の2次変異(エクソン20におけるT790M変異)(N Engl J Med;2005, vol352, p 786-792)の出現が報告され治療戦略開発が急務となっている。T790M変異EGFRにも不可逆的に結合しEGFRチロシンキナーゼ活性を抑制する第2世代EGFR-TKIsが期待されているが、単剤治療での臨床試験結果は十分とは言えない。本研究においては第2世代EGFR-TKIsを用いたT790M獲得耐性を克服する新治療開発を目的とする。

B. 研究方法

第2世代EGFR-TKIsであるBIBW2992がT790MをもつEGFR-TKIs耐性肺癌細胞株のThymidylate Synthase (TS)発現に及ぼす影響を検討し、BIBW2992とTS標的抗癌剤(S-1, ペメトレキセド)との併用療法の効果をin vitro, in vivoにて検討した。

C. 研究結果

BIBW2992はT790MをもつEGFR-TKIs耐性肺癌細胞株において上流の転写因子であるE2F-1を介してTSの発現を抑制した。さらにこれらの耐性肺癌細胞を用いたin vitro, in vivoの実験によりBIBW2992とTSを標的とする抗癌剤(S-1あるいはペメトレキセド)との併用は相乗的に抗腫瘍効果を発揮することが示された。

D. 考察

我々はこれまでに上皮成長因子受容体(EGFR)チロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKIs)であるゲフィチニブが腫瘍細胞のThymidylate Synthase (TS)の発現を抑制することにより、TSを標的とする経口フッ化ピリミジン製剤S-1との併用療法によって相乗効果を示すことを見出し報告してきた(Molecular Cancer Therapeuti

cs 7(3) 599-606, 2008)。しかしEGFRにT790M耐性変

異が生じ、ゲフィチニブに対して獲得耐性を呈した細胞においては、ゲフィチニブによるTS発現低下が認められず、ゲフィチニブ・S-1の併用効果は認めないことも報告してきた(Clinical Cancer Research 15(3) 907-13, 2009)。今回の実験結果から、BIBW2992などの第2世代EGFR-TKIsを用いることでTSを標的とする抗癌剤(S-1あるいはペメトレキセド)との併用効果が期待され、今後の臨床試験の実施が待たれる。

E. 結論

第2世代EGFR-TKIsとTSを標的とする抗癌剤(S-1あるいはペメトレキセド)との併用療法は、臨床で大きな問題となっているEGFR-TKIsへの獲得耐性克服の一つの方向性である。

F. 健康危険情報

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. Okamoto I, Shimizu T, Miyazaki M, Tsurutani J, Ichikawa Y, Terashima M, Takeda M, Fumita S, Ohki E, Kimura N, Hashimoto J, Nakagawa K, Feasibility study of two schedules of sunitinib in combination with pemetrexed in patients with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs*:2011;in press
2. Takeda K, Hida T, Sato T, Ando M, Seto T, Satouchi M, Ichinose Y, Katakami N, Yamamoto N, Kudoh S, Sasaki J, Matsui K, Takayama K, Kasahii T, Iwamoto Y, Sawa T, Okamoto I, Kurata T, Nakagawa K, Fukuoka M, Randomized Phase II Trial of Platinum-Doublet Chemotherapy Followed by Gefitinib Compared With Continued Platinum-Doublet Chemotherapy in Japanese Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Can

- cer: Results of a West Japan Thoracic Oncology Group Trial (WJTOG0203). *Journal of Clinical Oncology* 28(5):753-760;2010
3. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, Seto T, Satouchi M, Tada H, Hirashima T, Asami K, Katakami N, Takada M, Yoshioka H, Shibata K, Kudoh S, Shimizu E, Saito H, Toyooka S, Nakagawa K, Fukumura M; for the West Japan Oncology Group. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harboring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncology* 11(2):121-128;2010
 4. Kaneda H, Arao T, Tanaka K, Tamura D, Aomastu K, Kudo K, De Velasco M A, Mastumoto K, Fujita Y, Yamada Y, Tsurutani J, Okamoto I, Nakagawa K, Nishio K, FOXQ1 is overexpressed in colorectal cancer and enhances tumorigenicity and tumor growth. *Cancer Research* 70(5):2053-2063, 2010
 5. Shimizu T, Okamoto I, Tamura K, Satoh T, Miyazaki M, Akashi Y, Ozaki T, Fukuoka M, Nakagawa K, Phase I clinical and pharmacokinetic study of the glucose-conjugated cytotoxic agent D-19575 (glufosfamide) in patients with solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 65:243-250;2010
 6. Yoshida T, Okamoto I, Okamoto W, Hatashita E, Yamada Y, Kuwata K, Nishio K, Fukuoka M, J?nne 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 Science* 101(1):167-172;2010
 7. Okamoto K, Okamoto I, Takezawa K, Tachibana I, Fukuoka M, Nishimura Y, Nakagawa K, Cisplatin and Etoposide Chemotherapy Combined with Early Concurrent Twice-daily Thoracic Radiotherapy for Limited-disease Small Cell Lung Cancer in Elderly Patients. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 40(1):54-9;2010
 8. Kaneda H, Okamoto I, Hayashi H, Yoshioka H, Miyazaki M, Kudoh S, Kimura T, Sugiura T, Sawa T, Takeda K, Iwamoto Y, Satouchi M, Akita K, Saito H, Goto I, Shibata K, Fukuoka M, Nakagawa K, Phase II Trial of Amrubicin for Second-Line Treatment of Advanced Non-small Cell Lung Cancer: Results of the West Japan Thoracic Oncology Group Trial (WJTOG0401). *Journal of Thoracic Oncology* 5(1):105-9;2010
 9. Takeda M, Okamoto I, Fujita Y, Arao 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. *Journal of Thoracic Oncology* 5(3) 399-400;2010
 10. Iwasa T, Okamoto I, Takezawa K, Yamanaka K, Nakahara T, Kita A, Koutoku H, Sasamata M, Hatashita E, Yamada Y, Kuwata K, Fukuoka M, Nakagawa K, Marked anti-tumour activity of the combination of YM155, a novel survivin suppressant, and platinum-based drugs. *British Journal of Cancer* 103(1):36-42;2010
 11. Takezawa K, Okamoto I, Tsukioka S, Uchida J, Kuniwa M, Fukuoka M, Nakagawa K, Identification of thymidylate synthase as a potential therapeutic target for lung cancer. *British Journal of Cancer* 103(3):354-361 2010
 12. Takezawa K, Okamoto I, Tanizaki J, Kuwata K, Yamaguchi H, Fukuoka M, Nishio K, Nakagawa K, Enhanced anticancer effect of the combination of BIBW2992 and thymidylate synthase-targeted agents in non-small cell lung cancer with the T790M mutation of epidermal growth factor receptor. *Molecular Cancer Therapeutics* 9(6):1647-1656;2010
 13. Tanizaki J, Okamoto I, Takezawa K, Tsukioka S, Uchida J, Kuniwa M, Fukuoka M, Nakagawa K, Synergistic antitumor effect of S-1 and HER2-targeting agents in gastric cancer with HER2 amplification. *Molecular Cancer Therapeutics* 9(5):1198-1207;2010
 14. Okamoto W, Okamoto I, Yoshida T, Okamoto K, Takezawa K, Hatashita E, Yamada Y, Kuwata K, Arao T, Yanagihara K, Fukuoka M, Nishio K, Nakagawa K, Identification of c-Src as a potential therapeutic target for gastric cancer and of MET activation as a cause of resistance to c-Src inhibition. *Molecular Cancer Therapeutics* 9(5):1188-1197;2010
 15. Takeda M, Okamoto I, Makimura C, Fukuoka M, Nakagawa K, Successful treatment with erlotinib after gefitinib-induced severe interstitial lung disease. *Journal of Thoracic Oncology* 5(7):1103-1104;2010
 16. Takeda M, Okamoto I, Fukuoka M, Nakagawa K,

- Successful treatment with erlotinib after gefitinib-related severe hepatotoxicity, *Journal of Clinical Oncology* 28(17): e274-274;2010
17. Hayashi H, Okamoto I, Ichikawa Y, Miyazaki M, Yoshioka H, Kunimasa K, Nakagawa K, Retreatment of recurrent malignant pleural mesothelioma with cisplatin and Pemetrexed, *International Journal of Clinical Oncology* 15(5):497-499;2010
 18. Okamoto W, Okamoto I, Tanaka K, Hatashita E, Yamada Y, Kuwata K, Yamaguchi H, Arao T, Nishio K, Fukuoka M, Janne PA, Nakagawa K, TAK-701, a humanized monoclonal antibody to HGF, reverses gefitinib resistance induced by tumor-derived HGF in non-small cell lung cancer with an EGFR mutation. *Molecular Cancer Therapeutics* 9(10):2785-2792;2010.
 19. Okamoto K, Okamoto I, Okamoto W, Tanaka K, Takezawa K, Kuwata K, Yamaguchi H, Nishio K, Nakagawa K, Role of survivin in EGFR inhibitor-induced apoptosis in non-small cell lung cancers positive for EGFR mutations. *Cancer Research* 70(24):10402-10410;2010
 20. Okamoto I, Doi T, Ohtsu A, Miyazaki M, Tsuya A, Kurei K, Kobayashi K, Nakagawa K, Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of RAD001 (Everolimus) Administered Daily to Japanese Patients with Advanced Solid Tumors. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 40(1):17-23;2010
 21. Okamoto I, Munakata M, Miyazaki M, Satoh T, Takahata T, Takamatsu Y, Muto O, Koike K, Ishitani K, Mukaiyama T, Sakata Y, Nakagawa K, Tamura K, Disturbance of the Growth Hormone-Insulin-like Growth Factor-1 Axis Associated with Poor Performance Status in Patients with Solid Tumors. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 40(3):222-226;2010
 22. Okamoto I, Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR-targeted anticancer therapy. *FEBS Journal*. 277(2):309-15;2010
 23. Okamoto I, Miyazaki M, Morinaga R, Kaneda H, Ueda S, Hasegawa Y, Satoh T, Kawada A, Fukuoka M, Fukino K, Tanigawa T, Nakagawa K, Phase I clinical and pharmacokinetic study of sofenavir in combination with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Investigational New Drugs* 28(6):844-853;2010
 24. Okamoto I, Takeda K, Daga H, Miyazaki M, Yonesaka K, Kiyota H, Tsurutani J, Ueda S, Ichikawa Y, Takeda M, Sekiguchi R, Tominaga K, Enatsu S, Nambu Y, Nakagawa K, Does escalation study of pemetrexed in combination with carboplatin followed by pemetrexed maintenance therapy for advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 70(2):168-173;2010
 25. Okamoto I, Kaneda H, Satoh T, Okamoto W, Miyazaki M, Morinaga R, Ueda S, Terashima M, Tsuya A, Sarashina A, Konishi K, Arao T, Nishio K, Kaiser R, Nakagawa K, Phase I Safety, Pharmacokinetic, and Biomarker Study of BIBF 1120, an Oral Triple Tyrosine Kinase Inhibitor in Patients with Advanced Solid Tumors. *Molecular Cancer Therapeutics* 9(10):2825-2833;2010
 26. Okamoto I, Yoshioka H, Morita S, Ando M, Takeda K, Seto T, Yamamoto N, Saka H, Asami K, Hirashima T, Kudoh S, Satouchi M, Ikeda N, Iwamoto Y, Sawa T, Miyazaki M, Tamura K, Kurata K, Fukuoka M, Nakagawa K, Randomized, open-label, phase III, noninferiority trial comparing oral S-1 plus carboplatin with paclitaxel plus carboplatin in chemotherapy-naïve patients with advanced non-small cell lung cancer: results of a West Japan Oncology Group (LETS) study. *Journal of Clinical Oncology* 28(36):5240-5246;2010
 27. Kidera Y, Satoh T, Ueda S, Okamoto W, Okamoto I, Fumita S, Yonesaka K, Hayashi H, Makimura C, Okamoto K, Kiyota H, Tsurutani J, Miyazaki M, Yoshinaga M, Fujiwara K, Yamazoe Y, Moriyama K, Tsubaki M, Chiba Y, Nishida S, Nakagawa K, High-dose dexamethasone plus anti-histamine prevents colorectal cancer patients treated with modified FOLFOX6 from hypersensitivity reactions induced by oxaliplatin. *International Journal of Clinical Oncology*:2011;in press
 28. Azuma K, Tsurutani J, Sakai K, Kaneda H, Fujisaka Y, Takeda M, Watatani M, Arao T, Satoh T, Okamoto I, Kurata T, Nishio K, Nakagawa K, Switching addictions between HER2 and FGFR2 in HER2-positive breast tumor cells: FGFR2 as a potential target for salvage after lapatinib failure. *Biochem Biophys Res Commun*:2011;in press
 29. Hayashi H, Okamoto I, Nakagawa K, Perirenal hematoma associated with Bevacizumab. *Investi*

gational New Drugs:2011;in press

30. Takeda M, Okamoto I, Hirabayashi N, Kitano M, Nakagawa K, Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase expression level sare associated with response to S-1 plus carboplatin in advanced non-small cell lung cancer. Lung Cancer:2011;in press
31. Takezawa K, Okamoto I, Okamoto W, Takeda M, Sakai K, Tsukioka S, Kuwata K, Yamaguchi H, Nishio K, Nakagawa K, Tymidylate synthase as a determinant of pemetrexed sensitivity in non-small cell lung cancer. British Journal of Cancer:2011;in press
32. Takezawa K, Okamoto I, Nishio K, Janne P, Nakagawa K, Role of ERK-BIM and STAT3-survivin signaling pathways in ALK inhibitor-induced apoptosis in EML4-ALK-positive lung cancer. Clinical Cancer Research:2011;in press
33. Tanizaki J, Okamoto I, Fumita S, Okamoto W, Nishio K, Nakagawa K, Roles of BIM induction and survivin down-regulation in lapatinib-induced apoptosis in breast cancer cells with HER2 amplification. Oncogene:2011;in press
34. Okamoto I, Takahashi T, Okamoto H, Nakagawa K, Watanabe K, Nakamatsu K, Nishimura Y, Fukuoka M, Yamamoto N, Single-agent gefitinib with concurrent radiotherapy for locally advanced non-small cell lung cancer harboring mutations of the epidermal growth factor receptor. Lung Cancer:2011;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
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

31遺伝子の発現解析に基づくTP53-signatureはTP53のfunctional statusをTP53変異よりもより正確に反映し、術前化学療法の効果予測にも有用であることが示唆された。

A. 研究目的

がん抑制遺伝子であるTP53は乳がんの10-20%で変異が認められる。TP53に変異を有する乳がん細胞株は化学療法に耐性であると報告がなされているが、臨床研究ではTP53変異と化学療法耐性との相関は未だ明らかにされていない（TP53変異はむしろ化学療法感受性の指標であるとの報告もなされている）。TP53変異と化学療法の効果との相関が未だ明確にされていない原因の一つとしてとして、TP53変異の大半を占めるmissense mutationの機能喪失が一様でないことがあげられる。近年、TP53変異よりも、機能喪失が明らかなTP53変異から作成したTP53-signature（遺伝子発現解析に基づく）の方がより乳がんの悪性度（予後）と相関するとの報告がなされた。そこで、今回我々は、TP53変異とTP53-signatureの何れが化学療法の効果と相関するかを術前化学療法の系を用いて検討した。

B. 研究方法

(1) 現時点で最も効果が高いと考えられる術前化学療法（paclitaxel 80mg/m² q1w x 12 cycles → FEC75（5-FU 500mg/m² + epirubicin 75mg/m² + cyclophosphamide 500mg/m²）q3w x 4 cycles（以下、P-FEC療法）を原発乳癌患者（stage II, III）を対象として実施した（n=72例）。

(2) 化学療法施行前にマンモトームを用いてTP53変異解析および遺伝子発現解析用の腫瘍組織を採取し凍結保存した。また、化学療法の効果を病理学的に判定した。

(3) Direct sequence法でTP53の変異（全 exon）を解析した（変異あり（TP53 mt）、変異なし（TP53 wt））。また、Takahashi S.ら（Cancer Sci 99（2008）324-32）の手法を用いて各乳がんのTP53-signature（31遺伝子発現に基づく）を算出し、変

異 signature 群（TP53 mt-like）と野生 signature 群（TP53 wt-like）に分類した。

（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) TP53の変異とTP53-signatureの相関：

72症例の内、16（22%）例にTP53変異が認められた（Missense 11例、frameshift 4例、and splice site 1例）。また、27例はTP53 mt-like、45例はTP53 wt-likeであった。27例のTP53 mt-likeの内11例はTP53 mtであった。45例のTP53 wt-likeの内40例はTP53 wtであった。従って、TP53変異とTP53-signatureの一致率は71%であった（図1）。

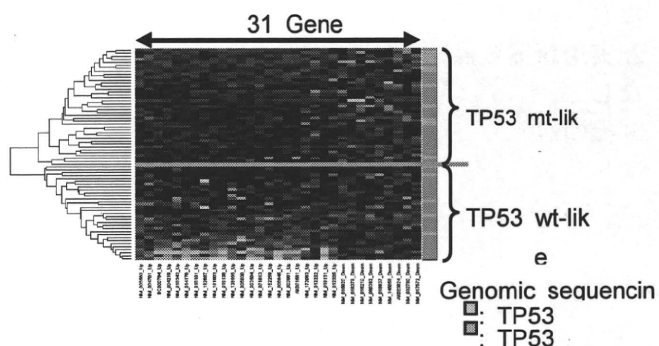


図1. TP53変異とTP53-signature

(2) TP53変異、p53免疫染色およびTP53 signatureと術前化学療法の効果との相関：

TP53変異およびp53免疫染色結果とP-FEC療法の効果（pCR、病理学的完全寛解）の間に有意の相関は認め

られなかった。一方、TP53 mt-likeはTP53 wt-likeに比して有意に高いpCR率を示した($P=0.019$) (図2)。

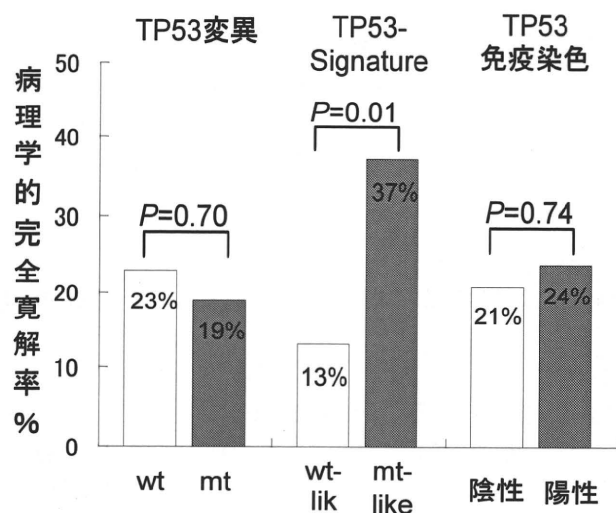


図2. TP53変異、TP53-signature、TP53免疫染色とP-FEC療法の効果

D. 考察

今回の検討から、TP53変異やTP53免疫染色の結果はP-FEC療法の効果とは相関しないことが判明した。また、興味あることに、TP53-signatureがP-FEC療法の効果と相関することが分かった。TP53-signatureはTP53のfunctional statusをTP53変異よりもより正確に反映している可能性が示唆された。TP53の機能喪失のあるがんでは化学療法によるDNA damageに対する修復機構が適切に働かず、DNAが修復されないまま細胞がG2/Mに進行しcatastrophic cell deathを起こすのではないかと想像される。

E. 結論

TP53-signatureは乳がんのP-FEC療法への効果予測に有用である可能性が示唆された。

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

- Iwamoto, T., Yamamoto, N., Taguchi, T., Tamaki, Y., and Noguchi, S. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood cells is associated with increased risk of breast cancer with BRCA1 promoter methylation.

Breast Cancer Res Treat, Published online 30 September 2010.

- Naoi, Y., Kishi, K., Tanei, T., Tsunashima, R., Tominaga, N., Baba, Y., Kim, S. J., Taguchi, T., Tamaki, Y., and Noguchi, S. High genomic grade index associated with poor prognosis for lymph node-negative and estrogen receptor-positive breast cancers and with good response to chemotherapy. Cancer, Published online 27 September 2010
- Nukatsuka, M., Saito, H., Nakagawa, F., Abe, M., Uchida, J., Shibata, J., Matsuo, K. I., Noguchi, S., and Kuniwa, M. Oral fluoropyrimidine may augment the efficacy of aromatase inhibitor via the down-regulation of estrogen receptor in estrogen-responsive breast cancer xenografts. Breast Cancer Res Treat, Published online 31 August 2010
- Naoi, Y., Kishi, K., Tanei, T., Tsunashima, R., Tominaga, N., Baba, Y., Kim, S. J., Taguchi, T., Tamaki, Y., and Noguchi, S. Development of 95-gene classifier as a powerful predictor of recurrences in node-negative and ER-positive breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat, Published online 29 August 2010.
- Motomura, K., Ishitobi, M., Komoike, Y., Koyama, H., Nagase, H., Inaji, H., and Noguchi, S. Expression of Estrogen Receptor Beta and Phosphorylation of Estrogen Receptor Alpha Serine 167 Correlate with Progression-Free Survival in Patients with Metastatic Breast Cancer Treated with Aromatase Inhibitors. Oncology, 79: 55-61, 2010.
- Taguchi, T., Masuda, N., Nakayama, T., Motomura, K., Tsukamoto, F., Shimazu, K., Nomura, T., Morimoto, T., Yamamoto, H., Wakita, K., Nakano, Y., Yoneda, K., Inaji, H., Takatsuka, Y., and Noguchi, S. Phase II Trial in Japan of Sequential Administration of Weekly Paclitaxel Followed by FEC as Neoadjuvant Chemotherapy for Locally Advanced Breast Cancer [KBCSG0206 Trial: Kinki Breast Cancer Study Group (KBCSG)]. Oncology, 78: 302-308, 2010.

H. 知的財産等の出願・登録状況 (予定を含む。)

- 特許取得: なし
- 実用新案登録: なし
- その他

がん薬物療法に対するバイオマーカー特定とその臨床応用に関する研究

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

肝細胞がんの悪性化に深く関与する上皮間葉移行（EMT）に対して、分子標的薬sorafenibが強力な阻害活性を有することを明らかにした。本研究により分子標的薬によるシグナル伝達経路を介した「抗EMT効果」をはじめて示した。

A. 研究目的

上皮間葉移行（EMT, Epithelial mesenchymal transition）は、がん細胞において細胞遊走能亢進や足場非依存性細胞増殖などの悪性形質に関連することが知られている。またHGF/Metシグナルは、EMTを強力に誘導することおよび悪性形質に強く関連することが広く知られている。本研究ではsorafenibが肝細胞癌のEMTに与える作用を検討した。

B. 研究方法

肝細胞癌株としてHepG2, Huh7の2株を使用した。HGF（hepatocyte growth factor）によるシグナル変化およびEMT誘導効果は、カドヘリンスイッチを指標にウエスタンブロット法、realtime RT-PCR法などでEMTを検出した。EMTに特徴的な細胞形態変化は光学顕微鏡によって細胞のcell scattering, elongationを評価した。sorafenibのシグナル伝達経路の評価として（RAS-Raf-MEK経路）、MEK阻害薬U0126とPI3K阻害薬のwortmanninをコントロールとして検討した。

SNAILのノックダウンはsiRNAを用いた。HGFに誘導される細胞の遊走能は、薬剤投与下およびSNAIL-siRNA作用下の条件でMigration assayおよびScratch assayを用いて評価した。

（倫理面への配慮）

本研究はがん細胞株に対する基礎研究であるため、個人情報保護法や3省合同遺伝子倫理指針の対象には該当しない。

C. 研究結果

肝細胞がん株HepG2とHuh7に対して、まずHGFのシグナル活性化を評価した。HGFはMET受容体のシグナル経路を活性化し、EMTに特徴的な細胞形態変化を引き起こした。HGF刺激は、SNAIL/Snail を強力に誘導した。HGF刺激は上皮マーカーE-cadherin 発現を抑制し、間葉系マーカーN-cadherin・Fibronectin1の発現を誘導した。これら一連の変化からHGFは強力なEMT誘導因子であることを確認した。HGF刺激により発現亢進が見られたSnailが、EMTの本質的制御因子であるかど

うかを明らかにするためsiRNAを用いて、Snail発現抑

制を行ったところ、肝細胞がんにおいてSnailがHGF誘導性EMTに必要であることが明らかになった。次に、sorafenibとMEK阻害薬U0126は、HGF刺激による細胞形態変化、Snailの発現亢進、Cadherin switchingをほぼ完全に抑制した。そのメカニズムとしてsorafenibはRaf-MAPKのシグナル阻害作用によりSnailの発現を抑制し、肝細胞がんのEMTを抑制することが明らかになった。また、sorafenibはHGF誘導性の細胞遊走能を抑制した。

D. 考察

肝細胞癌において、sorafenibはSNAILの発現抑制を介して、HGF誘導性EMTを抑制することを明らかにした。この作用はsorafenibに特徴的なRaf/MEK/ERKシグナル抑制作用によるものと考えられる。また本研究で明らかにしたsorafenibによるEMT抑制作用は、sorafenib治療による臨床的有用性に関連していることが推察される。sorafenib治療に対するEMTの評価はバイオマーカーとして有用な可能性がある。

E. 結論

肝細胞がんに対してsorafenibは、Raf-MAPKシグナルの阻害によるSnail発現抑制によってEMTに対する強力な阻害活性を示した。この結果は、分子標的薬によるdirectな「Anti-EMT effect」をはじめて明らかにした。

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

1. Takeda, M., Okamoto, I., Fujita, Y., Arao, T., Ito, H., Fukuoka, M., Nishio, K., Nakagawa, K. De novo resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutation positive NSCLC

- patients. *J Thorac Oncol*, 5(3): 399-400, 2010.
2. Kaneda, H., Arao, T., Tanaka, K., Tamura, D., Aomatsu, K., Kudo, K., Sakai, K., De Velasco, MA., Matsumoto, K., Fujita, Y., Yamada, Y., Tsurutani, J., Okamoto, I., Nakagawa, K., Nishio, K. FOXQ1 is overexpressed in colorectal cancer and enhances tumorigenicity and tumor growth. *Cancer Res*, 70(5): 2053-63, 2010.
 3. Tamura, D., Arao, T., Tanaka, K., Kaneda, H., Matsumoto, K., Kudo, K., Aomatsu, K., Fujita, Y., Watanabe, T., Saijo, N., Kotani, Y., Nishimura, Y., Nishio, K. Bortezomib potentially inhibits cellular growth of vascular endothelial cells through suppression of G2/M transition. *Cancer Sci*, 101(6): 1403-8, 2010.
 4. Takezawa, K., Okamoto, I., Tanizaki, J., Kuwata, K., Yamaguchi, H., Fukuoka, M., Nishio, K., Nakagawa, K. Enhanced anticancer effect of the combination of BIBW2992 and thymidylate synthase-targeted agents in non-small cell lung cancer with the T790M mutation of epidermal growth factor receptor. *Mol Cancer Ther*, 9(6): 1647-56, 2010.
 5. Okamoto, W., Okamoto, I., Yoshida, T., Okamoto, K., Takezawa, K., Hatashita, E., Yamada, Y., Kuwata, K., Arao, T., Yanagihara, K., Fukuoka, M., Nishio, K., Nakagawa, K. Identification of c-Src as a potential therapeutic target for gastric cancer and of MET activation as a cause of resistance to c-Src inhibitor. *Mol Cancer Res*, 9(5): 1188-97, 2010.
 6. Yamada, Y., Arao, T., Matsumoto, K., Gupta, V., Tan, Woei, Fedynshyn, J., Nakajima, T., Shimada, Y., Hamaguchi, T., Kato, K., Taniguchi, H., Saito, Y., Matsuda, T., Moriya, Y., Akasu, T., Fujita, S., Yamamoto, S., Nishio, K. Plasma concentrations of VCAM-1 and PAI-1: A predictive biomarker for post-operative recurrence in colorectal cancer. *Cancer Sci*, 101(8): 1886-90, 2010.
 7. Ohkawa, Y., Miki, K., Suzuki, T., Nishio, K., Sugita, T., Kinoshita, K., Takahashi, K., Koyama, K. Antiangiogenic metabolites from a marine-derived fungus, hypocreavinosin. *J Nat Prod*, 73(4): 579-82, 2010.
 8. Kaneko, A., Tsukada, M., Fukai, M., Suzuki, T., Nishio, K., Miki, K., Kinoshita, K., Takahashi, K., Koyama, K. KDR kinase inhibitor isolated from the mushroom *boletopsis leucomelas*. *J Nat Prod*, 73(5): 1002-4, 2010.
 9. Tominaga, E., Tsuda, H., Arao, T., Nishimura, S., Takano, M., Kataoka, F., Nomura, H., Hirasawa, A., Aoki, D., Nishio, K. Tyrosine kinase inhibitor in patients with advanced solid tumors. *Gynecol Oncol*, 118(2): 160-6, 2010.
 10. Okamoto, I., Satoh, T., Okamoto, W., Miyazaki, M., Morinaga, R., Ueda, S., Terashima, M., Tsuya, A., Sarshina, A., Konishi, K., Arao, T., Nishio, K., Kaiser, R., Nakagawa, K. Phase I safety, pharmacokinetic, and biomarker study of BIBF 1120, an oral triple. *Mol Cancer Ther*, 9(10): 2825-33, 2010.
 11. Kasahara, K., Arao, T., Sasaki, K., Matsumoto, K., Sakai, A., Kimura, H., Sone, T., Horiike, A., Nishio, M., Ohira, T., Ikeda, N., Yamanaka, T., Saijo, N., Nishio, K. Impact of serum HGF on treatment response to EGFR tyrosine kinase inhibitors in patients with non-small-cell lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 16(18): 4616-24, 2010.
 12. Hagiwara, S., Kudo, M., Ueshima, K., Chung, H., Yamaguchi, M., Takita, M., Haji, S., Kimura, M., Arao, T., Nishio, K., Park, AM., Munakata, H. The cancer stem cell marker CD133 is a predictor of the effectiveness of S1+ pegylated interferon alpha-2b therapy against advanced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*, 46(2):212-21, 2011.
 13. Okamoto, W., Okamoto, I., Tanaka, K., Hatashita, E., Yamada, Y., Kuwata, K., Yamaguchi, H., Arao, T., Nishio, K., Fukuoka, M., Janne, PA., Nakagawa, K. TAK-701, a humanized monoclonal antibody to HGF, reverses gefitinib resistance induced by tumor-derived HGF in non-small cell lung cancer with an EGFR mutation. *Mol Cancer Ther*, 9(10): 2785-92, 2010.
 14. Izumi, H., Wakasugi, T., Shimajiri, S., Tanimoto, A., Sasaguri, Y., Kashiwagi, E.,

- Yasuniwa, Y., Akiyama, M., Han, B., Wu, Y., Uchiyama, T., Arao, T., Nishio, K., Yamazaki, R., Kohno, K. Role of ZNF143 in tumor growth through transcriptional regulation of DNA replication and cell cycle-associated genes. *Cancer Sci*, 101(12): 2538-45, 2010.
15. Aomatsu, K., Arao, T., Sugioka, K., Matsumoto, K., Tamura, D., Kudo, K., Kaneda, H., Tanaka, K., Fujita, Y., Shimomura, Y., Nishio, K. TGF- β induces sustained up-regulation of SNAIL and SNAIL2 through Smad and non-Smad pathways in a human corneal epithelial cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, E-pub ahead of print, 2010.
16. Tamura, K., Shimizu, C., Hojo, T., Akashi-Tanaka, S., Kinoshita, T., Yonemori, K., Kouno, T., Katsumata, N., Ando, M., Aogi, K., Koizumi, F., Nishio, K., Fujiwara, Y. Fc γ R 2A and 3A polymorphisms predict clinical outcome of trastuzumab in both neoadjuvant and metastatic settings in patients with HER2 positive breast cancer. *Ann Oncol*, E-pub ahead of print, 2010.
17. Okamoto, K., Okamoto, I., Okamoto, W., Tanaka, K., Takezawa, K., Kuwata, K., Yamaguchi, H., Nishio, K., Nakagawa, K. Role of survivin in EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in EGFR mutation-positive non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 70(24): 10402-10, 2010.
18. Kudo, K., Arao, T., Tanaka, K., Nagai, T., Furuta, K., Sakai, K., Kaneda, H., Matsumoto, K., Tamura, D., Aomatsu, K., Marco DA., Fujita, Y., Saijo, N., Kudo, M., Nishio, K. Antitumor activity of BIBF 1120, a Triple Angiokinase Inhibitor, and Use of VEGFR2+pTyr+ Peripheral Blood Leukocytes as a Pharmacodynamic Biomarker. *Clin Cancer Res*, E-pub ahead of print, 2010.
19. Nagai, T., Arao, T., Furuta, K., Sakai, K., Kudo, K., Kaneda, H., Tamura, D., Aomatsu, K., Kimura, H., Fujita, Y., Matsumoto, K., Saijo, N., Kudo, M., Nishio, K. Sorafenib inhibits the hepatocyte growth factor-mediated epithelial mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma *Mol Cancer Ther*, 10(1): 169-77, 2011.
20. Kim, HK., Choi, IJ., Kim, CG., Kim, HS., Ohima, A., Yamada, Y., Arao, T., Nishio, K., Michalowski, A., Green, JE. Three-gene predictor of clinical outcome for gastric cancer patients treated with chemotherapy. *The Pharmacogenomics J*, E-pub ahead of print, 2010.
21. Kashiwagi, E., Izumi, H., Yasuniwa, Y., Baba, R., Doi, Y., Kidani, A., Aaro, T., Nishio, K., Naito, S., Kohno, K. Enhanced expression of nuclear factor I/B in oxaliplatin-resistant human cancer cell lines. *Cancer Sci*, 102(2): 382-9, 2011.
22. Kato, H., Nishimura, T., Ikeda, N., Yamada, T., Kondo, T., Saijo, N., Nishio, K., Fujimoto, J., Marco-Varga, G., et al. Developments for a growing Japanese patient population: Facilitating new technologies for future health care. *J Proteomics*, E-pub ahead of print, 2011.
23. Yamada, K., Yamamoto, N., Yamada, Y., Nokihara, H., Fujiwara, Y., 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. *Clin Cancer Res*, E-pub ahead of print, 2011.
24. Azuma, K., Tsurutani, J., Sakai, K., Kaneda, H., Fujisaka, Y., Takeda, M., Watatani, M., Arao, T., Satoh, T., Okamoto, I., Kurata, T., Nishio, K., Nakagawa, K. Switching addictions between HER2 and FGFR2 in HER2-positive breast tumor cells: FGFR2 as a potential target for salvage after lapatinib failure. *Biochem Biophys Res Commun.*, E-pub ahead of print, 2011.
25. Takezawa, K., Okamoto, I., Nishio, K., Janne, P., Nakagawa, K. Role of ERK-BIM and STAT3-survivin signaling pathway in ALK inhibitor-induced apoptosis in EML4-ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res*, E-pub ahead of print, 2011.
- H. 知的財産等の出願・登録状況（予定を含む。）
1. 特許出願
1. 薬剤性肺障害の発生リスク予測、該リスク予測のための遺伝子の検出方法及び検出用キット（特願2010-130992）発明者：小泉史明、西尾和人、他
2. EML4-ALK融合遺伝子の高感度検出方法（特願2010-254179）発明者：西尾和人、荒尾徳三、外4名

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1	Ohyanagi, F., Horai, T., Sekine, I., Yamamoto, N., Nakagawa, K., Nishio, M., Senger, S., Morsli, N., <u>Tamura, T.</u>	Safety of BLP25 Liposome Vaccine (L-BLP25) in Japanese Patients with Unresectable Stage III NSCLC after Primary Chemoradiotherapy: Preliminary Results from a Phase I/II Study.	Jpn. J. Clin. Oncol.		in press	2011
2	Sekine, I., Sumi, M., Ito, Y., Horinouchi, H., Nokihara, H., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Kubota, K., <u>Tamura, T.</u>	Phase I Study of Concurrent High-Dose Three-Dimensional Conformal Radiotherapy with Chemotherapy Using Cisplatin and Vinorelbine for Unresectable Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer.	Int J Radiat Oncol Biol Phys.		in press	2011
3	Ueda, Y., Shimoyama, T., Murakami, H., Yamamoto, N., Yamada, Y., Arioka, H., <u>Tamura, T.</u>	Phase I and pharmacokinetic study of TSU-68, a novel multiple receptor tyrosine kinase inhibitor, by twice daily oral administration between meals in patients with advanced solid tumors.	Cancer Chemother Pharmacol.	67(5)	1101-9	2011
4	Murakami, H., Ueda, Y., Shimoyama, T., Yamamoto, N., Yamada, Y., Arioka, H., <u>Tamura, T.</u>	Phase I, pharmacokinetic, and biological studies of TSU-68, a novel multiple receptor tyrosine kinase inhibitor, administered after meals with solid tumors.	Cancer Chemother Pharmacol.	67(5)	1119-28	2011
5	Yamada, K., Yamamoto, N., Yamada, Y., Nokihara, H., Fujiwara, Y., Hirata, T., <u>Koizumi, F., Nishio, K., Koyama, N., Tamura, T.</u>	Phase I Dose-Escalation Study and Biomarker Analysis of E7080 in Patients with Advanced Solid Tumors.	Clin Cancer Res.	17(8)	2528-37	2011
6	Sato, Y., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., <u>Minami, H.</u> , Laird, NM., Katori, N., Saito, Y., Ohnami, S., Sakamoto, H., Sawada, JI., Saijo, N., Yoshida, T., <u>Tamura, T.</u>	Genome-Wide Association Study on Overall Survival of Advanced Non-small Cell Lung Cancer Patients Treated with Carboplatin and Paclitaxel.	J Thorac Oncol.	6(1)	132-138	2011
7	Sekine, I., Kubota, K., Tamura, Y., Asahina, H., Yamada, K., Horinouchi, H., Nokihara, H., Yamamoto, N., <u>Tamura, T.</u>	Innovator and generic cisplatin formulations: comparison of renal toxicity.	Cancer Sci.	102(1)	162-5	2011