

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田村 友秀

平成24(2012)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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田村 友秀

平成24（2012）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

1. 分子標的薬のがん個別化治療への応用----- 9  
南 博信

2. 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----- 12  
小泉 史明

3. 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----- 15  
桑野 信彦

4. 抗がん剤の分子標的評価と最適化研究----- 18  
服部 明

5. 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----- 20  
杉本 芳一

6. 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----- 22  
岡本 勇

7. 乳癌の化学療法効果予測法の開発に関する研究----- 25  
野口 眞三郎

8. 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----- 28  
西尾 和人

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 32

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 国立がん研究センター中央病院 呼吸器腫瘍科 呼吸器内科長

研究要旨

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）胃癌 FFPE 検体を用い、FGFR2 遺伝子増幅を 4%（11/267 例）に認めた。（2）高感度で血中腫瘍ゲノムを検出法する OS-MSP 法を開発し、乳癌 336 例を解析した。（3）ゲフィチニブによる EGFR 変異肺癌株のアポトーシスには、Akt 経路を介したサバイビン発現低下が関与した。（4）IGF-1R 阻害薬と MET 阻害薬に対する獲得耐性モデルを作成し、耐性機構を解析した。（5）KRAS 変異大腸癌株では、セツキシマブによる ADCC 活性も抑制された。（6）変異 EGFR 遺伝子コピー減少はゲフィチニブ耐性を誘導した。（7）新規 BCRP 阻害薬は SN-38 感受性を増強した。（8）HIF-1 ヘテロ二量体化を標的とする薬剤探索のため、二分子蛍光相補法による評価系を構築した。

研究分担者

南 博信	神戸大学大学院医学系研究科	教授
小泉史明	国立がん研究センター研究所	ユニット長
桑野信彦	九州大学大学院薬学研究院	特命教授
服部 明	京都大学大学院薬学研究院	准教授
杉本芳一	慶應義塾大学薬学部	教授
岡本 勇	近畿大学医学部	准教授
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

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する。

C. 研究結果

（1）胃癌手術例 267 症例の FFPE（パラフィン包埋ホルマリン固定）サンプルからマクロダイセクションで DNA を抽出し、qPCR ベースの Copy number assay を用いて DNA コピー数検討を行った。国内外で初めて FGFR2 の遺伝子増幅を 4.1%（11 例/267 例）に確認し、10 コピー以上の高度遺伝子増幅は、2%以上にあたる 6 例が特定された。FGFR2 コピー数の増加は、FGFR2 に対する FISH でも確認され、結果は完全に一致していた。FGFR2 増幅胃癌は予後不良の傾向にあった。FGFR2 増幅胃癌に対する FGFR 標的治療の臨床導入が期待される。

（2）血中循環腫瘍ゲノム検出法として、GSTP1, RASSF1A, RARb のプロモーター領域のメチル化をターゲットに、従来法の約 200 倍の感度の OS-MSP 法を開発した。I/II 期乳癌 336 例の術前血清では、33 例（10%）で何れかの遺伝子のメチル化を認め、メチル化陰性例に比して有意に予後不良であった（術後 100 か月の全生存割合、78% vs 95%）。また、血清中の全 DNA 量高値例（n=112）は低値例（n=224）に比しては予後不良であった（86% vs

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について、（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、を実施することで、治療の最適化を目指す

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

97%)。メチル化陽性かつ全 DNA 量高値症例 (n=18) の予後は更さらに不良であった。

(3) EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌株におけるゲフィチニブ暴露によるアポトーシスでは、IAP family 蛋白であるサバイビンの発現量が低下し、この発現低下は AKT 経路に依存していることを示した。サバイビン強制発現株では、ゲフィチニブによるアポトーシスが抑制された。この AKT-サバイビン経路は ERK-BIM 経路とは別々にアポトーシスに関連していることを示した。

(4) Inulin-like Growth Factor-1 Receptor (IGF-1R) 阻害薬 (NVP-AEW541; NVP) と MET 阻害薬 (PHA-665752; PHA) に対する獲得耐性モデルを作成し、耐性化の分子機構を検討した。NVP に対する獲得耐性機構として、Akt-S6K 間のシグナル途絶、および S6K/RTK 依存的な cyclin D1 の発現が重要であることが示唆された。PHA に対する獲得耐性として、MET 遺伝子 Y1230H 変異が関わっていることが示唆された。

(5) 抗 EGFR 抗体セツキシマブによる ADCC 効果について、KRAS 変異大腸癌細胞株と遺伝子工学的に KRAS 変異を欠損させた株を用いて解析した。セツキシマブ単独暴露で、変異株は増殖抑制を示さず、変異欠損株はわずかな増殖抑制効果を認めた。4hr 暴露での ADCC アッセイでは、両株で同程度の活性が認められたが、パーフォリン非依存的 ADCC 効果では、変異欠損株のみで ADCC 効果を認めた。以上より、KRAS 変異はセツキシマブの直接効果を阻害するのみならず、ADCC 効果を抑制することによっても治療抵抗性を誘導する可能性が示唆された。

(6) 肺癌細胞において活性型変異 EGFR 遺伝子コピーの消失または減少は EGFR-TKI の耐性を誘導した。SNX2 は c-Met の膜表層発現を特異的に制御することにより分子標的薬の感受性を変化させた。YB-1 はグリオーマの薬剤耐性と増殖さらに胃癌細胞の HER2/erB2 発現を制御した。他方、VEGFR 及び NF- $\kappa$ B シグナルを阻害する新規薬剤は VEGF や IL-1 誘導の血管新生と腫瘍血管新生を著明に抑制した。

(7) BCRP (ABCG2) 発現細胞は irinotecan、gefitinib などの抗癌剤に耐性を示す。新規 BCRP 阻害薬である YHO-13177 は強い BCRP 阻害作用を持ち、P-gp と MRP1 を阻害しなかった。YHO-13177 は、BCRP 発現ヒト癌細胞の SN-38 感受性を数倍増強した。また、種々の SNP 型、変異型 BCRP 対して阻害作用を示したが、F431L-BCRP は阻害でしなかつ

た。YHO-13177 の水溶性プロドラッグ YHO-13351 は、P338/BCRP および HCT116/BCRP のマウス移植モデルにおいて、irinotecan の効果を増強した。

(8) HIF-1 ヘテロ二量体化を標的とした新しい抗癌剤の探索・開発に向けて、HIF-1 ヘテロ二量体化の評価系を構築した。HIF-1 各サブユニットの PAS ドメインを介した結合を蛍光タンパク質 Kusabira-Green (KG) を用いた二分子蛍光相補法で検出することができた。再構築 KG の核内局在は内在性 HIF-1 と同じであった。さらに Doxycycline (Dox) による転写制御システムを導入し、非特異的な相互作用によるバックグラウンドを低減させた。

#### D. 考察

薬物療法では、臨床効果や毒性に大きな個体差が存在し、有効例でもいずれ耐性を生じる。最大限の効果を得るには、「適切な患者に適切な治療を」という薬物療法の最適化が必要である。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、規定因子の解明は、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が期待される。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。

#### E. 結論

胃癌 FFPE 検体を用い、FGFR2 遺伝子増幅を 4% に認めた。高感度血中腫瘍ゲノム検出法を開発し、乳癌 336 例を解析した。ゲフィチニブによるアポトーシスには、Akt 経路を介したサバイビン発現低下が関与した。IGF-1R 阻害薬と MET 阻害薬に対する獲得耐性モデルを作成した。KRAS 変異大腸癌では、セツキシマブによる ADCC 活性も抑制された。変異 EGFR 遺伝子コピー減少はゲフィチニブ耐性を誘導した。BCRP 阻害薬は SN-38 感受性を増強した。HIF-1 ヘテロ二量体化を標的とする薬剤探索のための評価系を構築した。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sekine, I., Sumi, M., Ito, Y., Horinouchi, H., Nokihara, H., Yamamoto, N., Kunitoh,

- H., Ohe, Y., Kubota, K., Tamura, T. 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.*, 82(2):953-9, 2012.
- 2) Asahina, H., Sekine, I., Horinouchi, H., Nokihara, H., Yamamoto, N., Kubota, K., Tamura, T. Retrospective Analysis of Third-Line and Fourth-Line Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*, 13(1):39-43, 2012.
  - 3) Watari, K., Nakamura, M., Fukunaga, Y., Furuno, A., Shibata, T., Kawahara, A., Hosoi, F., Kuwano, T., Kuwano, M. and Ono, M. The antitumor effect of a novel angiogenesis inhibitor (an octahydronaphthalene derivative) targeting both VEGF receptor and NF- $\kappa$ B pathway. *Int. J. Cancer*, in press, 2012.
  - 4) Azuma, K., Kawahara, A., Hattori, S., Taira, T., Tsurutani, J., Watari, K., Shibata, T., Murakami, Y., Takamori, S., Ono, M., Izumi, H., Kage, M., Yanagawa, T., Nakagawa, K., Hoshino, T., Kuwano, M. NDRG1/Cap43/Drg-1 may predict tumor angiogenesis and poor outcome in patients with lung cancer. *J. Thorac. Oncol.*, in press, 2012.
  - 5) Kawanobe, T., Kogure, S., Nakamura, S., Sato, M., Katayama, K., Mitsuhashi, J., Noguchi, K., Sugimoto, Y. Expression of human ABCB5 confers resistance to taxanes and anthracyclines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 418(4):736-741, 2012.
  - 6) 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.*, 30(2):639-646, 2012.
  - 7) Takeda, M., Okamoto, I., Sakai, K., Tanaka, K., Terashima, M., Nishio, K., Nakagawa, K. Successful long-term treatment with pemetrexed of NSCLC associated with EML4-ALK and low thymidylate synthase expression. *Clinical Lung Cancer*, 13(2):157-159, 2012.
  - 8) Okamoto, K., Okamoto, I., Hatashita, E., Kuwata, K., Yamaguchi, H., Kita, A., Yamanaka, K., Ono, M., Nakagawa, K. Overcoming Erlotinib Resistance in EGFR Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Targeting Survivin. *Mol. Cancer Therapeutics*, 11(1):204-213, 2012.
  - 9) Naoi, Y., Tanei, T., Kishi, K., Tsunashima, R., Tominaga, N., Baba, Y., Nakayama, T., Shimazu, K., Kim, S.J., Tamaki, Y., Noguchi, S. 70-Gene classifier for differentiation between paclitaxel- and docetaxel-sensitive breast cancers. *Cancer Lett.*, 314(2):206-212, 2012.
  - 10) Yamamoto, N., Nakayama, T., Kajita, M., Miyake, T., Iwamoto, T., Kim, S. J., Sakai, A., Ishihara, H., Tamaki, Y., Noguchi, S. Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1, RASSF1A, and RARbeta2 in serum DNA of patients with breast cancer by a newly established one-step methylation-specific PCR assay. *Breast Cancer Res. Treat.*, 132(1):165-173, 2012.
  - 11) Tamaki, Y., Sato, N., Homma, K., Takabatake, D., Nishimura, R., Tsujimoto, M., Yoshidome, K., Tsuda, H., Kinoshita, T., Kato, H., Taniyama, K., Kamio, T., Nakamura, S., Akiyama, F., Noguchi, S. Routine clinical use of the one-step nucleic acid amplification assay for detection of sentinel lymph node metastases in breast cancer patients: Results of a multicenter study in Japan. *Cancer*, in press, 2012.
  - 12) Kim, S.J., Nakayama, S., Shimazu, K., Tamaki, Y., Akazawa, K., Tsukamoto, F., Torikoshi, Y., Matsushima, T., Shibayama, M., Ishihara, H., Noguchi, S. Recurrence risk score based on the specific activity of CDK1 and CDK2 predicts response to neoadjuvant paclitaxel followed by 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide in breast cancers. *Annals Oncol.*, in press, 2012.

- 13) Okishiro, M., Kim, S.J., Tsunashima, R., Nakayama, T., Shimazu, K., Shimomura, A., Maruyama, N., Tamaki, Y., Noguchi, S. MDM2 SNP309 and TP53 R72P associated with severe and febrile neutropenia in breast cancer patients treated with 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide. *Breast Cancer Res Treat.*, in press, 2012.
- 14) Aomatsu, K., Arao, T., Abe, K., Kodama, A., Sugioka, K., Matsumoto, K., Kudo, K., Kimura, H., Fujita, Y., Hayashi, H., Nagai, T., Shimomura, Y., Nishio, K. Slug is upregulated during wound healing and regulates cellular phenotypes in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 53(2):751-6, 2012.
- 15) Tanaka, K., Arao, T., Tamura, D., Aomatsu, K., Furuta, K., Matsumoto, K., Kaneda, H., Kudo, K., Fujita, Y., Kimura, H., Yanagihara, K., Yamada, Y., Okamoto, I., Nakagawa, K., Nishio, K. SRPX2 is a novel chondroitin sulfate proteoglycan that is overexpressed in gastrointestinal cancer. *Plos One*, 7(1):e27922, 2012.
- 16) Matsumoto, K., Arao, T., Hamaguchi, T., Shimada, Y., Kato, K., Oda, I., Taniguchi, H., Koizumi, F., Yanagihara, K., Sasaki, H., Nishio, K., Yamada, Y. FGFR2 gene amplification and clinicopathological features in gastric cancer. *Br J Cancer*, 106(4):727-732, 2012.
- 17) Tanizaki, J., Okamoto, I., Takezawa, K., Sakai, K., Azuma, K., Kuwata, K., Yamaguchi, H., Hatashita, E., Nishio, K., Janne, PA., Nakagawa, K. Combined effect of ALK and MEK inhibitors in EML4-ALK-positive non-small-cell lung cancer cells. *Br J Cancer*, 106(4):763-7, 2012.
- 18) Murakami, H., Tamura, T., Takahashi, T., Nokihara, H., Naito, T., Nakamura, Y., Nishio, K., Seki, Y., Sarashina, A., Shahidi, M., Yamamoto, N. Phase I study of continuous afatinib (BIBW2992) in patients with advanced non-small cell lung cancer after prior chemotherapy/erlotinib/gefitinib (LUX-Lung 4). *Cancer Chemother Pharmacol.*, 69(4):891-9, 2012.
- 19) Furuta, K., Arao, T., Sakai, K., Kimura, H., Nagai, T., Tamura, D., Aomatsu, K., Kudo, K., Kaneda, H., Fujita, Y., Matsumoto, K., Yamada, Y., Yanagihara, K., Sekijima, M., Nishio, K. Integrated analysis of whole genome exon array and array-comparative genomic hybridization in gastric and colorectal cancer cells. *Cancer Sci.*, 103(2):221-7, 2012.
- 20) Goto, K., Ichinose, Y., Ohe, Y., Yamamoto, N., Negoro, S., Nishio, K., Itoh, Y., Jiang, H., Duffield, E., McCormack, R., Saijo, N., Mok, T., Fukuoka, M. Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum: from IPASS, a phase III study of gefitinib or carboplatin/paclitaxel in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.*, 7(1):115-21, 2012.
- 21) Azuma, K., Okamoto, I., Kawahara, A., Taira, T., Nakashima, K., Hattori, S., Kinoshita, T., Takeda, M., Nakagawa, K., Takamori, S., Kuwano, M., Ono, M., Kage, M. Association of the expression of mutant epidermal growth factor receptor protein as determined with mutation-specific antibodies in non-small cell lung cancer with progression-free survival after gefitinib treatment. *J. Thorac. Oncol.*, 7(1):122-127, 2012.
- 22) Kodera, Y., Katanasaka, Y., Kitamura, Y., Tsuda, H., Nishio, K., Tamura, T., Koizumi, F. Sunitinib inhibits lymphatic endothelial cell functions and lymph node metastasis in a breast cancer model through inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 3. *Breast Cancer Res.*, 13(3):R66, 2011.
- 23) 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*, 29(6):1198-205, 2011.
- 24) Sekine, I., Kubota, K., Tamura, Y., Asahina, H., Yamada, K., Horinouchi, H., Nokihara, H., Yamamoto, N., Tamura, T. Innovator and generic cisplatin formulations: comparison of renal toxicity. *Cancer Sci.*, 102(1):162-5, 2011.
- 25) Furugen, M., Sekine, I., Tsuta, K.,

- Horinouchi, H., Nokihara, H., Yamamoto, N., Kubota, K., Tamura, T. Combination chemotherapy with carboplatin and paclitaxel for advanced thymic cancer. *Jpn J Clin Oncol.*, 41(8):1013-1016, 2011.
- 26) Yoshida, H., Sekine, I., Tsuta, K., Horinouchi, H., Nokihara, H., Yamamoto, N., Kubota, K., Tamura, T. Amrubicin monotherapy for patients with previously treated advanced large-cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Jpn J Clin Oncol.*, 41(7):897-901, 2011.
- 27) Sato, Y., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Minami, H., Laird, NM., Katori, N., Saito, Y., Ohnami, S., Sakamoto, H., Sawada, J., Saijo, N., Yoshida, T., Tamura, T. Genome-wide association study detected candidate polymorphisms associated with overall survival in advanced non-small cell lung cancer treated with carboplatin and paclitaxel. *J Thorac Oncol.*, 6(1):132-138, 2011.
- 28) Okamura, A., Yakushijin, K., Inui, Y., Funakoshi, Y., Kawamori, Y., Shimada, T., Toyoda, M., Chayahara, N., Kiyota, N., Fujiwara, Y., Mukohara, T., Matsuoka, H., Yamamoto, K., Minami, H. Successful neutrophil engraftment by reduced use of granulocyte colony-stimulating factor after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with mycophenolate mofetil for graft-versus-host disease prophylaxis. *Int J Hematol.*, 93(6):765-70, 2011.
- 29) Tahara, M., Minami, H., Hasegawa, Y., Tomita, K., Watanabe, A., Nibu, K., Fujii, M., Onozawa, Y., Kurono, Y., Sagae, D., Seriu, T., Tsukuda, M. Weekly paclitaxel in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 68(3):769-776, 2011.
- 30) Yamamoto, K., Matsuoka, H., Yakushijin, K., Funakoshi, Y., Okamura, A., Hayashi, Y., Minami, H. A novel five-way translocation, t(3;9;13;8;14) (q27;p13;q32;q24;q32), with concurrent *MYC* and *BCL6* rearrangements in primary bone marrow B-cell lymphoma. *Cancer Genetics.*, 204(9):501-506, 2011.
- 31) Tahara, M., Araki, K., Okano, S., Kiyota, N., Fuse, N., Minashi, K., Yoshino, T., Doi, T., Zenda, S., Kawashima, M., Ogino, T., Hayashi, R., Minami, H., Ohstu, A. Phase I trial of combination chemotherapy with docetaxel, cisplatin and S-1 (TPS) in patients with locally advanced or recurrent/metastatic head and neck cancer (HNC). *Ann Oncol.*, 22(1):175-80, 2011.
- 32) Tahara, M., Minami, H., Kawashima, M., Kawada, K., Mukai, H., Sakuraba, M., Matsuura, K., Ogino, T., Hayashi, R., Ohtsu, A. Phase I trial of chemoradiotherapy with the combination of S-1 plus cisplatin for patients with unresectable locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Sci.*, 102(2):419-24, 2011.
- 33) Yamamoto, K., Matsuoka, H., Funakoshi, Y., Yakushijin, K., Okamura, A., Itoh, T., Minami, H. A novel dicentric chromosome, dic(9;9) (p12;q34), leading to trisomy 9 in follicular lymphoma without t(14;18). *Leukemia Res (Letter).*, 35(7):e100-3, 2011.
- 34) Yamamoto, K., Yakushijin, K., Funakoshi, Y., Inui, Y., Okamura, A., Matsuoka, H., Minami, H. Biallelic *ETV6* rearrangements by recurrent translocations t(7;12) (p15;p13) and t(3;12) (q26.2;p13) in acute myeloid leukemia. *Leukemia Res.*, 35(11):e212-4, 2011.
- 35) Kataoka, Y., Mukohara, T., Tomioka, H., Funakoshi, Y., Kiyota, N., Fujiwara, Y., Yashiro, M., Hirakawa, K., Hirai, M., Minami, H. Foretinib (GSK1363089), a multi-kinase inhibitor of MET and VEGFRs, inhibits growth of gastric cancer cell lines by blocking inter-receptor tyrosine kinase networks. *Invest New Drugs.*, in press, 2011.
- 36) Uramoto, H., Shimokawa, H., Hanagiri, T., Kuwano, M., Ono, M. Expression of selected gene for acquired drug resistance to EGFR-TKI in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*, 73(3):361-365, 2011.
- 37) Fotovati, A., Abu-Ali, S., Lee, C., Wang, PS., Franciosi, S., Nakamura, Y., Chou, A., Kanemura, Y., Yamada, T., Sugita, Y.,



- Uchiumi, T., Kuwano, M., Roskams, J., Blair, Levit, B., Pallen, C.J. and SE, Dunn. YB-1 bridges neural stem cells and brain tumor-initiating cells via its roles in differentiation and cell growth. *Cancer Res.*, 71(16):5569-5578, 2011.
- 38) Fujiwara, T., Fukushi, J., Yamamoto, S., Matsumoto, Y., Setsu, N., Oda, Y., Yamada, H., Okada, S., Watari, K., Ono, M., Kuwano, M., Kamura, S., Iida, K., Okada, Y., Koga, M., Iwamoto, Y. Macrophage infiltration predicts poor prognosis for the human Ewing's sarcoma family of tumors. *Am. J. Pathol.*, 179(3):1157-1170, 2011.
- 39) Fotovati, A., Abu-Ali, S., Kage, M., Shirouzu, K., Yamana, H., Kuwano, M. N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1) a differentiation marker of human breast cancer. *Pathol. Oncol. Res.*, 17(3):525-533, 2011.
- 40) Nakano, K., Kobayashi, M., Nakamura, K.I., Nakanishi, T., Asano, R., Kumagai, I., Tahara, H., Kuwano, M., Cohen, J.B., and Glorioso, J.C. Mechanism of HSV infection through soluble adapter-mediated virus bridging to the EGF receptor. *Virology*, 413(1):12-18, 2011.
- 41) Kawahara, A., Akiba, J., Hattori, S., Yamaguchi, T., Abe, H., Taira, T., Ureshino, H., Murakami, Y., Watari, K., Koufujii, K., Shirouzu, K., Kuwano, M., Ono, M. and Kage, M. Nuclear expression of N-myc downstream regulated gene 1/Ca<sup>2+</sup>-associated protein 43 is closely correlated with tumor angiogenesis and poor survival in patients with gastric cancer. *Exp. Ther. Med.*, 2:471-479, 2011.
- 42) Akiba, J., Murakami, Y., Noda, M., Watari, K., Ogasawara, S., Yoshida, T., Kawahara, A., Sanada, S., Yasumoto, M., Yamaguchi, R., Kuwano, M., Ono, M., Yano, H. N-myc downstream regulated gene1/Cap43 overexpression suppresses tumor growth by hepatic cancer cells through cell cycle arrest at G0/G1 phase. *Cancer Lett.*, 310(1):25-34, 2011.
- 43) Ohno, Y., Hattori, A., Ueda, M., Kageyama, T., Yoshiki, T., Kakeya, H. Multiple NF- $\kappa$ B binding CCAAT boxes are essential for transcriptional regulation of the human C7orf24 gene, a novel tumor-associated gene. *FEBS J.*, 278(21):4088-4099, 2011.
- 44) Yamazaki, R., Nishiyama, Y., Furuta, T., Hatano, H., Igarashi, Y., Kodaira, H., Takahashi, H., Aiyama, R., Matsuzaki, T., Yagi, N., Sugimoto, Y. Novel acrylonitrile derivatives, YHO-13177 and YHO-13351, reverse BCRP/ABCG2-mediated drug resistance *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cancer Ther.*, 10(7):1252-1263, 2011.
- 45) Masuda, Y., Noguchi, K., Segawa, H., Tanaka, N., Katayama, K., Mitsuhashi, J., Sugimoto, Y. Novel regulatory role for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded vFLIP in chemosensitization to bleomycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 415(2):305-312, 2011.
- 46) Yasuda, A., Noguchi, K., Minoshima, M., Kashiwazaki, G., Kanda, T., Katayama, K., Mitsuhashi, J., Bando, T., Sugiyama, H., Sugimoto, Y. A DNA ligand designed to antagonize EBNA1 represses Epstein-Barr virus-induced immortalization. *Cancer Sci.*, 102(12):2221-2230, 2011.
- 47) 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*, 30(39):4097-4106, 2011.
- 48) Yonesaka, K., Zejnullahu, K., Okamoto, I., Satoh, T., Cappuzzo, F., Souglakos, J., Ercan, D., Rogers, A., Roncalli, M., Takeda, M., Fujisaka, Y., Philips, J., Shimizu, T., Maenishi, O., Cho, Y., Sun, J., Destro, A., Taira, K., Takeda, K., Okabe, T., Swanson, J., Itoh, H., Takada, M., Lifshits, E., Okuno, K., Engelman, A., J, Shivdasani, A, R., Nishio, K., Fukuoka, M., Garcia, V, M., Nakagawa, K. and Jänne, A. P. Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Science Translation Med.*, 3(99):99ra86, 2011.
- 49) Tanizaki, J., Okamoto, I., Okamoto, K., Takezawa, K., Kuwata, K., Yamaguchi, H.,

- Nakagawa, K. MET Tyrosine Kinase Inhibitor Crizotinib (PF-02341066) Shows Differential Antitumor Effects in Non-small Cell Lung Cancer According to MET Alterations. *Journal of Thoracic Oncol.*, 6(10):1624-1631, 2011.
- 50) Tanizaki, J., Okamoto, I., Sakai, K., Nakagawa, K. Differential roles of trans-phosphorylated EGFR, HER2, HER3, and RET as heterodimerisation partners of MET in lung cancer with MET amplification. *British Journal of Cancer*, 105(6):807-813, 2011.
- 51) 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*, 72(1):199-204, 2011.
- 52) Takezawa, K., Okamoto, I., Okamoto, W., Takeda, M., Sakai, K., Tsukioka, S., Kuwata, K., Yamaguchi, H., Nishio, K., Nakagawa, K. Thymidylate synthase as a determinant of pemetrexed sensitivity in non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer*, 104(10):1594-1601, 2011.
- 53) 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 Res.*, 17(8):2140-8, 2011.
- 54) Okamoto, W., Okamoto, I., Arai, T., Yanagihara, K., Nishio, K., Nakagawa, K. Differential roles of STAT3 depending on the mechanism of STAT3 activation in gastric cancer cells. *British Journal of Cancer*, 105(3):407-412, 2011.
- 55) Takeda, M., Okamoto, I., Hirabayashi, N., Kitano, M., Nakagawa, K. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase expression levels are associated with response to S-1 plus carboplatin in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 73(1):103-109, 2011.
- 56) Iwamoto, T., Yamamoto, N., Taguchi, T., Tamaki, Y., 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.*, 129(1):69-77, 2011.
- 57) Kim, S.J., Masago, A., Tamaki, Y., Akazawa, K., Tsukamoto, F., Sato, J., Ozawa, T., Tsujino, Y., Noguchi, S. A novel approach using telomerase-specific replication-selective adenovirus for detection of circulating tumor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.*, 128(3):765-773, 2011.
- 58) Naoi, Y., Kishi, K., Tanei, T., Tsunashima, R., Tominaga, N., Baba, Y., Kim, S.J., Taguchi, T., Tamaki, Y., 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.*, 128(3):633-641, 2011.
- 59) Naoi, Y., Kishi, K., Tanei, T., Tsunashima, R., Tominaga, N., Baba, Y., Kim, S.J., Taguchi, T., Tamaki, Y., 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*, 117(3):472-479, 2011.
- 60) Naoi, Y., Kishi, K., Tanei, T., Tsunashima, R., Tominaga, N., Baba, Y., Kim, S.J., Taguchi, T., Tamaki, Y., Noguchi, S. Prediction of pathologic complete response to sequential paclitaxel and 5-fluorouracil/epirubicin/cyclophosphamide therapy using a 70-gene classifier for breast cancers. *Cancer*, 117(16):3682-3690, 2011.
- 61) Nukatsuka, M., Saito, H., Nakagawa, F., Abe, M., Uchida, J., Shibata, J., Matsuo, K., Noguchi, S., 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. and treat.*, 128(2):381-390, 2011.

- 62) Oshima, K., Naoi, Y., Kishi, K., Nakamura, Y., Iwamoto, T., Shimazu, K., Nakayama, T., Kim, S.J., Baba, Y., Tamaki, Y., Noguchi, S. Gene expression signature of TP53 but not its mutation status predicts response to sequential paclitaxel and 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide in human breast cancer. *Cancer Lett.*, 307(2):149-157, 2011.
- 63) Tanei, T., Shimomura, A., Shimazu, K., Nakayama, T., Kim, S.J., Iwamoto, T., Tamaki, Y., Noguchi, S. Prognostic significance of Ki67 index after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Eur J Surg Oncol.*, 37(2):155-161, 2011.
- 64) Yasojima, H., Shimomura, A., Naoi, Y., Kishi, K., Baba, Y., Shimazu, K., Nakayama, T., Kim, S.J., Tamaki, Y., Noguchi, S. Association between c-myc amplification and pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Eur J Cancer*, 47(12):1779-1788, 2011.
- 65) Nishio, M., Yamanaka, T., Matsumoto, K., Kimura, H., Sakai, K., Sakai, A., Sone, T., Horiike, A., Koizumi, F., Kasahara, K., Ohira, T., Ikeda, N., Saijo, N., Arao, T., Nishio, K. Serum heparan sulfate concentration is correlated with the failure of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor treatment in patients with lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.*, 6(11):1889-94, 2011.
- 66) Fujita, Y., Islam, R., Kaneda, H., Kudo, K., Tamura, D., Aomatsu, K., Nagai, T., Kimura, H., Matsutomo, K., Velasco, MA., Arao, T., Okawara, T., Nishio, K. Aza-derivatives of resveratrol are potent macrophage migration inhibitory factor inhibitors. *Invest New Drugs*, in press, 2011.
- 67) Kaneda, H., Arao, T., Matsumoto, K., Velasco, MA., Tamura, D., Aomatsu, K., Kudo, K., Sakai, K., Nagai, T., Fujita, Y., Tanaka, K., Yanagihara, K., Yamada, Y., Okamoto, I., Nakagawa, K., Nishio, K. Activin a inhibits vascular endothelial cell growth and suppresses tumor angiogenesis in gastric cancer. *Br J Cancer*, 5(8):1210-7, 2011.
- 68) 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.*, 407(1):219-24, 2011.
- 69) Kato, H., Nishimura, T., Ikeda, N., Yamada, T., Kondo, T., Saijo, N., Nishio, K., Fujimoto, J., Nomura, M., Oda, Y., Lindmark, B., Maniwa, J., Hibino, H., Unno, M., Ito, T., Sawa, Y., Tojo, H., Egawa, S., Edula, G., Lopez, M., Wigmore, M., Inase, N., Yoshizawa, Y., Nomura, F., Marko-Varga, G. Developments for a growing Japanese patient population: Facilitating new technologies for future health care. *J Proteomics*, 74(6):759-64, 2011.
- 70) Aomatsu, K., Arao, T., Sugioka, K., Matsumoto, K., Tamura, D., Kudo, K., Kaneda, H., Tanaka, K., Fujita, Y., Shimomura, Y., Nishio, K. TGF- $\beta$  induces sustained up-regulation of SNAI1 and SNAI2 through Smad and non-Smad pathways in a human corneal epithelial cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 52(5):2437-43, 2011.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)
1. 特許取得  
・ ソラフェニブの効果予測方法、西尾和人 他  
3名、特願 2011-104275、2011年5月9日出願
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
特になし

## 分子標的薬のがん個別化治療への応用

研究分担者 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：Inulin-like Growth Factor-1 Receptor (IGF-1R)阻害薬 (NVP-AEW541; NVP) とMET阻害薬 (PHA-665752; PHA) に対する獲得耐性モデルを作成し、耐性化の分子機構を検討した。NVPに対する獲得耐性機構として、Akt-S6K間のシグナル途絶、およびS6K/RTK依存的なcyclin D1の発現が重要であることが示唆された。PHAに対する獲得耐性として、MET遺伝子Y1230H変異が関わっていることが示唆された。

### A. 研究目的

我々は、Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors (RTK-I)の獲得耐性機構を明らかにすべく研究を進めている。今年度は、i) Insulin-like Growth Factor-1 Receptor (IGF-1R)阻害薬であるNVP-AEW541 (NVP)と、ii) MET阻害薬であるPHA-665752 (PHA)に対する耐性機構を探索した。

### B. 研究方法

我々の先行研究でNVPに高感受性を示したMCF-7乳癌細胞株 (Mukohara T et al, Cancer Lett 2009)と、PHAに高感受性を示したMKN-45胃癌細胞株 (Kataoka Y et al, Invest New Drug, in press)を、それぞれのRTK-Iに長期間曝露することによって、獲得耐性モデル (MCF-7-NR、MKN-45-PR)を樹立した。細胞増殖は、MTS assayで評価した。細胞周期分布はflowcytometryを用いて評価した。それぞれの親株との細胞内シグナルの相違は、Western-blot法およびphospho-RTK array (R&D)を用いて検討した。耐性への関与が示唆されたタンパクについては、特異的阻害薬を用いて機能抑制あるいはsiRNAを用いてknock-downし、その意義を確かめた。MKN-45およびMKN-45-PRのMET遺伝子exon 19の塩基配列は、direct sequence法で決定した。

#### (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) NVP獲得耐性

Western-blot法ではNVPの付加によりリン酸化型Aktは、MCF-7、MCF-7-NR両細胞株のいずれにおいても抑制されるのに対し、リン酸化型S6KはMCF-7-NRでのみ高く保たれ、AktとS6Kの間にシグナルの途絶があることが示唆された。それと一貫して、MCF-7-NRはAkt阻害薬perifotinineに比較的耐性であり、mTOR阻害薬everolimusにはMCF-7と同様の高感受性を示した。また、phospho-RTK arrayでは、MCF-7-NRでのみ、別のRTKのリン酸

化がNVP存在下にも高く保たれた。Western-blot法では、MCF-7においてのみNVPがこのRTKの発現を抑制する半面、everolimusは両細胞株において発現を抑制することから、このRTKの発現がmTOR/S6K依存的に調節されていることが示唆された。このRTKをsiRNAを用いてknock-downすると、両細胞株において、cyclin D1の発現と細胞増殖が抑制された (図1)。

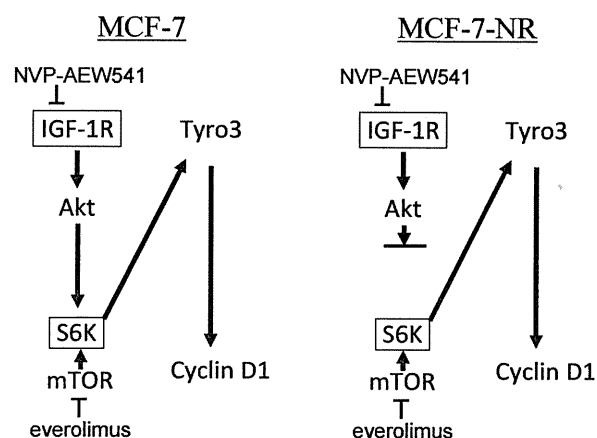


図1. NVP獲得耐性機構

#### ii) PHA獲得耐性

Western-blot法では、リン酸化型METがMKN-45では完全抑制されるのに対し、MKN-45-PRではほとんど抑制されなかった。MET遺伝子exon 19の塩基配列は、MKN-45-PRでのみ、一部のalleleにY1230H変異が検出され、METのPHA耐性を生化学的に説明するものと推測された (図2)。さらに、MKN-45-PRでは、PHA非存在下において、存在下よりも増殖速度がむしろ抑制されることが分かった。MKN-45-PRの細胞周期分布解析では、PHA非存在下で存在下に比してS期分布が増加しているものの、BrDUの取り込みの増加はないことから、MKN-45-PRではPHA非存在下にS期が遅延していることが示唆された。

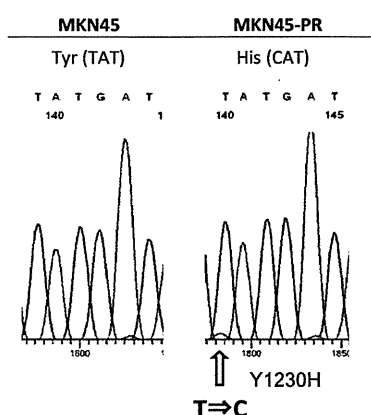


図2 MET遺伝子exon 19の塩基配列

#### D. 考察

i) 別のRTKシグナルがPHA耐性機構の一翼を担うことが示唆されたが、治療標的としての意義はほとんど検討されておらず、今後さらに評価を加える予定である。

ii) MKN-45-PRでみられたMET遺伝子のY1230H変異は他のMET増幅胃癌細胞株を用いた同様の研究でも報告されており (Qi, Cancer Res 2011)、PHA耐性獲得における普遍的な現象である可能性が示唆された。MKN-45-PRの増殖がPHA非存在下で抑制される現象は、臨床的には耐性化後、PHA投与の中断により病勢コントロールが得られる可能性を示唆する。その本体はS期遅延であると考えており、現在その分子機構について検討中である。

#### E. 結論

i) IGF-1R阻害薬NVPに対する獲得耐性機構として、Akt-S6K間のシグナル途絶が重要であることが示唆された。また、MCF-7、MCF-7-NRともに、別のRTKとcyclin D1の発現がS6K依存的であることが、MCF-7-NRにおいて、NVPによる増殖抑制を回避される分子機構の一つと考えられた。

ii) MET遺伝子Y1230H変異がPHA獲得耐性に関わっていることが示唆された。また、MKN-45-PRはPHA非存在下でS期が遅延し、PHA存在下よりも増殖が抑制されることが示唆された。

#### 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. Sato Y, Yamamoto N, Kunitoh H, Ohe Y, Minami

H, Laird NM, Katori N, Saito Y, Ohnami S, Sakamoto H, Sawada J, Saijo N, Yoshida T, Tamura T. Genome-wide association study detected candidate polymorphisms associated with overall survival in advanced non-small cell lung cancer treated with carboplatin and paclitaxel. J Thorac Oncol., 6(1):132-138, 2011.

2. Okamura A, Yakushijin K, Inui Y, Funakoshi Y, Kawamori Y, Shimada T, Toyoda M, Chayahara N, Kiyota N, Fujiwara Y, Mukohara T, Matsuoka H, Yamamoto K, Minami H. Successful neutrophil engraftment by reduced use of granulocyte colony-stimulating factor after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with mycophenolate mofetil for graft-versus-host disease prophylaxis. Int J Hematol., 93(6):765-70, 2011.
3. Tahara M, Minami H, Hasegawa Y, Tomita K, Watanabe A, Nibu K, Fujii M, Onozawa Y, Kurono Y, Sagae D, Seriu T, Tsukuda M. Weekly paclitaxel in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer. Cancer Chemother Pharmacol., 68(3):769-776, 2011.
4. Yamamoto K, Matsuoka H, Yakushijin K, Funakoshi Y, Okamura A, Hayashi Y, Minami H. A novel five-way translocation, t(3;9;13;8;14)(q27;p13;q32;q24;q32), with concurrent MYC and BCL6 rearrangements in primary bone marrow B-cell lymphoma. Cancer Genetics, 204(9):501-506, 2011.
5. Tahara M, Araki K, Okano S, Kiyota N, Fuse N, Minashi K, Yoshino T, Doi T, Zenda S, Kawashima M, Ogino T, Hayashi R, Minami H, Ohstu A. Phase I trial of combination chemotherapy with docetaxel, cisplatin and S-1 (TPS) in patients with locally advanced or recurrent/metastatic head and neck cancer (HNC). Ann Oncol., 22(1):175-80, 2011.
6. Tahara M, Minami H, Kawashima M, Kawada K,

- Mukai H, Sakuraba M, Matsuura K, Ogino T, Hayashi R, Ohtsu A. Phase I trial of chemoradiotherapy with the combination of S-1 plus cisplatin for patients with unresectable locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Sci.*, 102(2):419-24, 2011
7. Yamamoto K, Matsuoka H, Funakoshi Y, Yakushijin K, Okamura A, Itoh T, Minami H. A novel dicentric chromosome, dic(9;9)(p12;q34), leading to trisomy 9 in follicular lymphoma without t(14;18). *Leukemia Res.*, (Letter) 35(7):e100-3, 2011.
8. Yamamoto K, Yakushijin K, Funakoshi Y, Inui Y, Okamura A, Matsuoka H, Minami H. Biallelic *ETV6* rearrangements by recurrent translocations t(7;12)(p15;p13) and t(3;12)(q26.2;p13) in acute myeloid leukemia. *Leukemia Res.*, 35(11):e212-4, 2011.
9. Kataoka Y, Mukohara T, Tomioka H, Funakoshi Y, Kiyota N, Fujiwara Y, Yashiro M, Hirakawa K, Hirai M, Minami H. Foretinib (GSK1363089), a multi-kinase inhibitor of MET and VEGFRs, inhibits growth of gastric cancer cell lines by blocking inter-receptor tyrosine kinase networks. *Invest New Drugs*, 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

2. 実用新案登録

3. その他

「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」に関する研究

研究分担者 小泉 史明 国立がん研究センター研究所 ユニット長

研究要旨

EGFRを標的としたキメラ型IgG1抗体であるセツキシマブは、大腸癌でのKRASの遺伝子変異が治療抵抗性の予測因子であることが明らかになっている。これは下流シグナルの恒常的な活性化により、上流のEGFRの阻害が無効であるためと理解されているが、詳細は明らかでない。一方で、セツキシマブは、ADCC活性を有することが報告されているが、ADCC効果とKRAS変異との関係はほとんど明らかにされていない。KRAS変異を有する大腸癌細胞株と、その株を遺伝子工学的にKRAS変異を欠損させた株を用いて実験を行った。KRAS変異株はセツキシマブ単独での増殖抑制効果を示さず、KRAS変異欠損株はわずかな増殖抑制効果が得られた。4hr暴露でのADCCアッセイにおいては、KRAS変異に依らず同程度の活性が認められたが、パーフォリン非依存的なADCC効果を検討したところ、KRAS変異欠損株で認められるADCC効果がKRAS変異株では認められなかった。以上よりKRAS変異はセツキシマブの直接効果を阻害するのみでなく、ADCC効果を抑制することで、治療抵抗性を示す可能性が示唆された。

A. 研究目的

大腸がんのKRASの遺伝子変異は、セツキシマブの治療抵抗性因子であることが明らかになっているが、これは下流シグナルが恒常的に活性化しているため、上流のEGFRの阻害が無効であるためと考えられている。しかしセツキシマブのADCC効果とKRAS変異との関係はほとんど明らかにされていない。本研究は、KRAS変異がセツキシマブのADCC効果へ及ぼす影響について検討し、耐性のメカニズムを明らかにするとともに、抗体治療におけるADCCの重要性について検証することを目的とする。

B. 研究方法

・ターゲット細胞

ターゲット細胞は、KRAS変異を有する大腸癌細胞株（HCT116 (KRAS G13D/wt), DLD-1 (KRAS G13D/wt)）と、そのKRAS変異を遺伝子工学的な手法を用いて欠損させた株（Hkh2 (KRAS -/wt), DKO-4 (KRAS -/wt)）を用いた。

・細胞増殖抑制

細胞増殖抑制は、WST-8アッセイで測定し、アポトーシスの検出はTUNEL法を用いた。

・エフェクター細胞

エフェクター細胞はCD16a (FcγRⅢa) を強制発現させたNK細胞株であるNK92/CD16、または健康人ボランティアから得た末梢血単核球 (PBMC) を用いた。

・ADCC活性

ADCC活性の測定はCalceinアッセイまたはWST-8アッセイで行った。Calceinアッセイでは、抗体とエフェクター細胞の接触は4時間で、WST-8アッセイは24時間の接触により評価された。パーフォリンとグランザイム非依存的な細胞溶解活性を検討する際は、パーフォリン阻害剤であるコンカナマイシンAを用いた。

・シグナル抑制効果

セツキシマブのEGFRを介するシグナルに対する抑制効果は、Western blottingにて確認した。

(倫理面への配慮)

本研究は、臨床検体を取り扱わず、また動物実験も施行しない。用いた細胞は、すでに遺伝子組み換えが行われた既存の細胞であり、新たな組み換えは行わない。

C. 研究結果

・KRAS変異の有無によるセツキシマブの細胞増殖抑制効果（直接抑制効果）の検討

KRAS変異株HCT-116、DLD-1はセツキシマブ単独での増殖抑制効果を示さず、KRAS変異欠損株Hkh2、およびDKO-4ではわずかな増殖抑制効果が得られた（図1）。この結果は、セツキシマブのEGFRシグナル抑制効果がKRASの変異により阻害されることを示唆するものと思われる。しかしながら、いずれの細胞株においても、EGFRシグナルの抑制効果は認められなかった。

・ADCC活性

はじめに、CalceinアッセイにてセツキシマブのADCC活性を評価した。エフェクター細胞にはPBMCを用いた。本評価系は、抗体、エフェクター細胞の接触が4

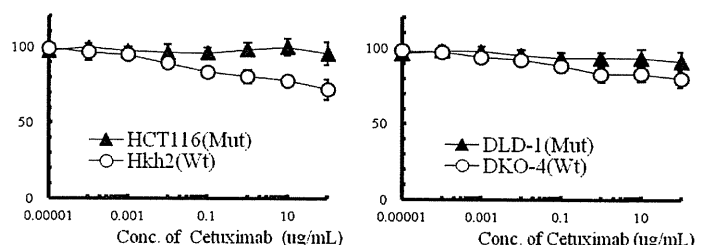


図1. セツキシマブの細胞増殖抑制効果（直接効果）

時間と短時間であり、主にパーフォリン依存的な細胞溶解が働くことが報告されている。本法においては、KRAS変異に依らず同程度の活性が認められた(図2)。続いて、パーフォリン阻害剤コンカナマイシンAを用いて、パーフォリン依存的な細胞溶解抑制下でADCCを評価した。コンカナマイシンA存在下で、Calceinアッセイを用いたADCC評価では、すべての細胞株でADCCが確認されなかった。これは、短時間の抗体との接触によるADCCがパーフォリン依存性であることを示している。WST-8を用いて24時間の接触条件でADCCを評価した。この方法では、KRAS変異欠損株Hkh2、DKO-4においてはADCC活性が認められるものの、KRAS変異株においては、ADCCによる細胞障害活性は発揮されなかった(図3.)。

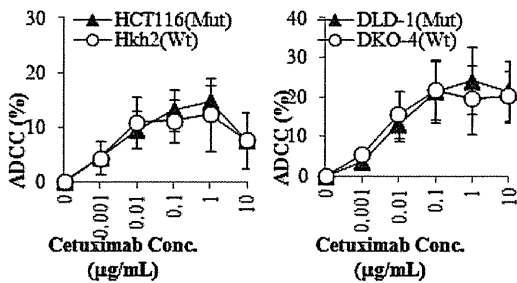


図2. 各種細胞株を用いたADCC活性 (Calceinアッセイ)

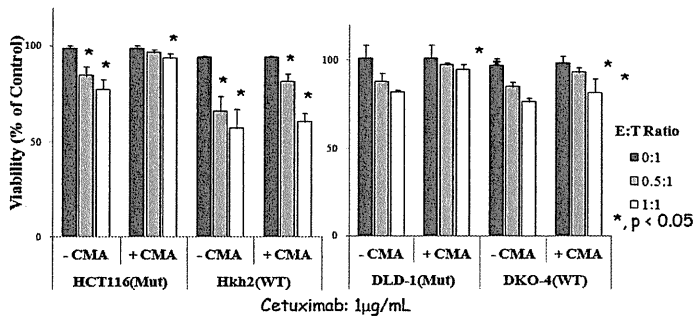


図3. コンカナマイシン存在下でのADCC活性 (WST-8アッセイ)

以上の結果は、エフェクター細胞にNK92/CD16を用いた場合でも同様であった。

#### ・セツキシマブによるアポトーシス誘導

セツキシマブによるアポトーシス誘導を、TUNEL法にて検討した。セツキシマブ単独では、KRASの変異に関わらず、有意なアポトーシス誘導は見られなかったが、エフェクター細胞存在下では、KRAS変異喪失株である、Hkh2にのみ著大なアポトーシス誘導が認められ

た(図4)。

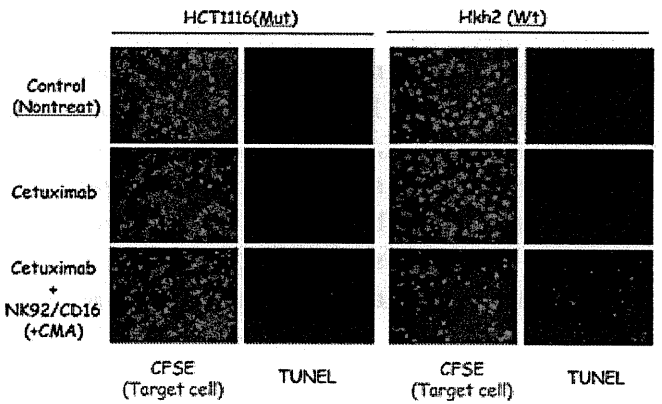


図4. セツキシマブによるアポトーシス誘導

#### D. 考察

大腸がんのKRAS遺伝子の変異は、セツキシマブの治療抵抗性のバイオマーカーであり、その機序は、EGFRシグナルの抑制がKRASの活性化により無効になるためと考えられている。今回の我々の結果から、KRAS遺伝子変異は、セツキシマブによるADCCにも抑制的に働くことが明らかとなった。これはパーフォリン非依存的なADCCを阻害するためと考えられた。またセツキシマブによるアポトーシスは、抗体単独では誘導されず、エフェクター細胞共存下で、KRAS遺伝子変異欠損株Hkh2にのみ著大なアポトーシスが誘導された。抗体によるADCCはパーフォリンを介する系と、Fas-FasLによるアポトーシスシグナルを介するものが知られている。パーフォリン系によるADCCは、KRAS変異の有無で差が認められないことから、Fas-FasLによるADCCに対してKRAS遺伝子変異が抑制的に働いたことが推測された。今回の我々の結果は、KRAS変異がセツキシマブのADCCの耐性因子であることを明らかにした。また抗体の作用機序として、ADCCが重要であることも同時に示唆された。

#### E. 結論

KRAS遺伝子の変異は、セツキシマブのADCC効果に対して抑制的に作用することが示された。これはパーフォリン非依存的なFas-FasLによるアポトーシスシグナルを介したADCC効果を抑制する可能性が示唆された。

#### 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. Matsumoto K, Arao T, Hamaguchi T, Shimada Y, Kato K, Oda I, Taniguchi H, Koizumi F, Yanagihara K, Sasaki H, Nishio K, Yamada Y. FGFR2



- gene amplification and clinicopathological features in gastric cancer. *Br J Cancer*, in press, 2012.
2. Yamauchi M, Yoshino I, Yamaguchi R, Shimamura T, Nagasaki M, Imoto S, Niida A, Koizumi F, Kohno T, Yokota J, Miyano S, Gotoh N. N-cadherin expression is a potential survival mechanism of gefitinib-resistant lungcancer cells. *Am J Cancer Res.*, 1(7):823-33, 2011.
  3. Nishio M, Yamanaka T, Matsumoto K, Kimura H, Sakai K, Sakai A, Sone T, Horiike A, Koizumi F, Kasahara K, Ohira T, Ikeda N, Saijo N, Arao T, Nishio K. Serum heparan sulfate concentration is correlated with the failure of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor treatment in patients with lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.*, 6(11):1889-94, 2011.
  4. Arao T, Matsumoto K, Furuta K, Kudo K, Kaneda H, Nagai T, Sakai K, Fujita Y, Tamura D, Aomatsu K, Koizumi F, Nishio K. Acquired drug resistance to vascular endothelial growth factor receptor 2 tyrosine kinase inhibitor in human vascular endothelial cells. *Anticancer Res.*, 31(9):2787-96, 2011.
  5. 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*, 29(6):1198-205, 2011.
  6. Kodera Y, Katanasaka Y, Kitamura Y, Tsuda H, Nishio K, Tamura T, Koizumi F. Sunitinib inhibits lymphatic endothelial cell functions and lymph node metastasis in a breast cancer model through inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 3. *Breast Cancer Res.*, 13(3):R66, 2011.
  7. 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.*, 17(8):2528-37, 2011.
  8. 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. *Ann On*

col., 22(6):1302-7, 2011.

H. 知的財産等の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

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 特命教授

研究要旨

がんの細胞の増殖因子受容体とその下流シグナルと転写制御因子などのうちから、がん分子標的薬治療の適正化に有用なマーカーを探索している。と同時に、がんの耐性、血管新生と転移に関与する新しいメカニズムと分子を基盤にしたがん創薬研究を進展させている。

A. 研究目的

がん薬物療法の適正化と新しい薬物療法の導入のために有用な新規バイオマーカーの探索とそれらを標的とした治療創薬の基盤を構築する。すなわち、

- (1) がん分子標的薬の耐性化に関与する新しいメカニズムを明らかにして関連分子のがん治療の適正化への有用性と実践への可能性を検討する。
- (2) 耐性ががんを克服するための薬物療法の導入に向けて耐性、がん血管新生及び転移/浸潤に関連する因子を標的とした新しい治療創薬を検討する。

B. 研究方法

- (1) 肺癌をはじめヒト癌由来のがん細胞株について *in vitro* 培養系で、EGFRやHER2標的薬やマルチキナーゼを段階的に濃度を上昇させて薬剤耐性株を単離した。移植可能な細胞株について *in vivo* 実験系で耐性獲得や耐性克服の有無を検討した。
- (2) 耐性獲得のメカニズムと関連する分子を明らかにするために *microarray* 法、western blot 及び定量 RT-PCR などを用いて感受性と耐性株を対比させた。さらに、野性型及び変異遺伝子コピーの有無については塩基配列、*sscp* 及び *place-sscp* 法で解析した。薬剤感受性復帰変異株について選択薬剤の非存在下に長期間培養して単離した。
- (3) 見出した新規耐性マーカーについて患者の耐性獲得に関与しているか否かを明らかにするために、耐性候補マーカーの抗体並びに遺伝子を駆使して外科切除標本や生検資料で発現レベル及び変異の有無を検討した。
- (4) がんの転移や血管新生また腫瘍増大の抑制及び耐性克服については *in vitro* 及び *in vivo* モデル実験系で検討した。特に腹膜播種については同所移植法、さらに血管新生については角膜法、背部皮下及び *Matrigel plug* 法などを用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験において苦痛の軽減をはじめ動物実験愛護上の配慮を行い、厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知（平成18年6月1日付）と九州大学動物実験指針を遵守した。さらにがん患者の外科切除標本の使用に関し

てはインフォームドコンセント、同意書及び個人情報保護など人権擁護に配慮し、九州大学及び久留米大学の各倫理委員会の了承を得た。

C. 研究結果

薬物療法の適正化と新しい治療法の薬に関して、本年度は以下の研究結果を得た。

- (1) EGFRチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)に対する適正化と耐性克服の治療法の導入に関して、EGFR・TKI耐性株を活性化変異を持つヒト肺癌細胞株11-18とPC9から各々樹立した。PC9由来の耐性株において変異EGFR遺伝子アレルの消失が観察された。さらに11-18由来の耐性株においては変異EGFR遺伝子コピーの減少が観察された。以上の結果から野性型EGFRと変異型EGFR遺伝子コピーの相対比が薬剤感受性や耐性に重要な役割を果たしていることが示唆された。
- (2) がん細胞膜表層の活性型増殖因子受容体の発現に関与する受容体膜輸送の制御因子Sorting Nexin (SNX)ファミリー遺伝子群の中からSNX2遺伝子をノックダウンすることによって、c-Metタンパク質の発現が特異的に減少し、Met・TKIに耐性をEGFR・TKIに感受性を示した。さらにSNX2はc-Met発現を細胞内エンドソーム/ライソソームへの輸送を制御することを明らかにした。
- (3) Y-ボックス結合蛋白-1 (YB-1) がグリオーマにおける薬剤耐性や腫瘍増大を促進することを見出した。YB-1は胃癌細胞において増殖因子受容体のうちHER2/ErB2の発現を特異的に制御し、胃癌組織においてYB-1の核内発現は有意にHER2発現と正に相関することを見出した。
- (4) N-myc downstream regulated gene1 (NDRG1) の発現上昇が胃癌や肺癌において血管新生を誘導し、がん患者の腫瘍血管密度と正に相関した。さらに新規のNF- $\kappa$ B経路阻害剤がVEGFRとIL-1Rを介して腫瘍血管新生と炎症反応を抑制することを見出した。

#### D. 考察

薬物療法の適正化に関して、活性型EGFR変異遺伝子コピーの減少また消失がゲフィチニブ/エルロチニブ耐性と関連した。この機序が肺癌患者の耐性に関与しているか否かを検討しておくことが大切である。さらに、EGFR・TKIだけでなくマルチキナーゼ阻害剤などに対する耐性株を単離し、全く新しい耐性メカニズムと関連分子を同定し、分子標的薬の治療適正化に貢献していきたい。他方、我々は新しい抗血管新生治療の研究を進めている。がんの間質にしばしば誘導される炎症反応や浸潤/転移と関連する血管新生に注目している。現在見出している腫瘍関連マクロファージやNF- $\kappa$ B/IL-1/VEGFRなどを標的とした治療薬に加えて、IL-1/IL-1R阻害剤について血管新生抑制と耐性がんの克服の有無について検討していきたい。

#### E. 結論

- (1) 肺がん細胞において活性型変異EGFR遺伝子コピーの消失また減少はEGFR・TKIの耐性を誘導した。さらに、SNX2はc-Metの膜表層発現を特異的に制御することにより分子標的薬の感受性を変化させた。
- (2) YB-1はグリオーマの薬剤耐性と増殖さらに胃がん細胞のHER2/erbB2発現を制御した。他方、VEGFR及びNF- $\kappa$ Bシグナルを阻害する新規薬剤はVEGFやIL-1誘導の血管新生と腫瘍血管新生を著明に抑制した。

#### 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. Uramoto, H., Shimokawa, H., Hanagiri, T., Kuwano, M., Ono, M. Expression of selected gene for acquired drug resistance to EGFR-TKI in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*, 73(3):361-365, 2011.
2. Fotovati, A., Abu-Ali, S., Lee, C., Wang, PS., Franciosi, S., Nakamura, Y., Chou, A., Kanemura, Y., Yamada, T., Sugita, Y., Uchiyama, T., Kuwano, M., Roskams, J., Blair, Levit, B., Pallen, CJ., and SE, Dunn. YB-1 bridges neural stem cells and brain tumor-initiating cells via its roles in differentiation and cell growth. *Cancer Res.*, 71(16): 5569-5578, 2011.
3. Fujiwara, T., Fukushi, J., Yamamoto, S., Matsumoto, Y., Setsu, N., Oda, Y., Yamada, H., Okada, S., Watari, K., Ono, M., Kuwano, M., Kamura, S., Iida, K., Okada, Y., Koga, M., Iwamoto, Y. Macrophage infiltration predicts poor prognosis for the human Ewing's sarcoma family of tumors. *Am. J. Pathol.*, 179(3):1157-1170, 2011.
4. Fotovati, A., Abu-Ali, S., Kage, M., Shirouzu, K., Yamana, H., Kuwano, M. N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1) a differentiation marker of human breast cancer. *Pathol. Oncol. Res.*, 17:(3)525-533, 2011.
5. Nakano, K., Kobayashi, M., Nakamura, KI., Nakanishi, T., Asano, R., Kumagai, I., Tahara, H., Kuwano, M., Cohen, JB., and Glorioso, JC. Mechanism of HSV infection through soluble adapter-mediated virus bridging to the EGF receptor. *Virology*, 413(1):12-18, 2011.
6. Kawahara, A., Akiba, J., Hattori, S., Yamaguchi, T., Abe, H., Taira, T., Ureshino, H., Murakami, Y., Watari, K., Koufujii, K., Shirouzu, K., Kuwano, M., Ono, M., and Kage, M. Nuclear expression of N-myc downstream regulated gene 1/Ca2+-associated protein 43 is closely correlated with tumor angiogenesis and poor survival in patients with gastric cancer. *Exp. Ther. Med.*, 2: 471-479, 2011.
7. Akiba, J., Murakami, Y., Noda, M., Watari, K., Ogasawara, S., Yoshida, T., Kawahara, A., Sanada, S., Yasumoto, M., Yamaguchi, R., Kuwano, M., Ono, M., Yano, H. N-myc downstream regulated gene1/Cap43 overexpression suppresses tumor growth by hepatic cancer cells through cell cycle arrest at G0/G1 phase. *Cancer Lett.*, 310(1): 25-34, 2011.
8. Azuma, K., Okamoto, I., Kawahara, A., Taira, T., Nakashima, K., Hattori, S., Kinoshita, T., Takeda, M., Nakagawa, K., Takamori, S., Kuwano, M., Ono, M., Kage, M. Association of the expression of mutant epidermal growth factor receptor protein as determined with mutation-specific antibodies in non-small cell lung cancer with progression-free survival after gefitinib treatment. *J. Thorac. Oncol.*, 7(1): 122-127, 2011.
9. Watari, K., Nakamura, M., Fukunaga, Y., Furuno, A., Shibata, T., Kawahara, A., Hosoi, F., Kuwano, T., Kuwano, M., and Ono, M. The antitumor effect of a novel angiogenesis

inhibitor (an octahydronaphthalene derivative) targeting both VEGF receptor and NF- $\kappa$ B pathway. Int. J. Cancer, in press, 2012.

10. Azuma, K., Kawahara, A., Hattori, S., Taira, T., Tsurutani, J., Watari, K., Shibata, T., Murakami, Y., Takamori, S., Ono, M., Izumi, H., Kage, M., Yanagawa, T., Nakagawa, K., Hoshino, T., Kuwano, M. NDRG1/Cap43/Drg-1 may predict tumor angiogenesis and poor outcome in patients with lung cancer. J. Thorac., Oncol., in press, 2012.

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