

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田村 友秀

平成25（2013）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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田村 友秀

平成25（2013）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----- 6
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----- 8
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----- 12
桑野 信彦
4. 抗がん剤の分子標的評価と最適化研究----- 14
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----- 16
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----- 18
岡本 勇
7. 乳癌の化学療法効果予測法の開発----- 20
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----- 22
西尾 和人

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 25

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 呼吸器内科 呼吸器内科長

研究要旨

薬物療法の最適化を目指した、バイオマーカーおよび薬剤感受性規定因子研究を行い、以下の成果を得た。(1)組織 FOXP3 陽性リンパ球が術前化学療法効果予測因子となった。(2)EGFR-TKI 耐性に関わる EGFRT790M 変異検出のための高感度コロニーハイブリダイゼーション法、マスアレイ法を用いた EML-ALK 融合遺伝子検出法を開発した。(3)Cetuximab による ADCC において、KRAS 変異は Fas-FasL を介したアポトーシスを抑制する。(4)エルロチニブ抵抗性細胞においてサバイビン阻害剤併用効果を確認した。(5)エルロチニブ耐性細胞で、 $\beta 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 5$ インテグリンの発現と活性化が耐性に関与した。(6)MKN45/MET 遺伝子増幅胃癌細胞から MET 阻害薬耐性モデルを作成した。(7)新規 Pim-1 選択的阻害薬 T1 は、FLT-ITD 発現ヒト AML 細胞に有効性を示した。(8)二分子蛍光相補法を用いた HIF-1 ヘテロ二量体化の新規薬剤評価系を構築した。

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科	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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

本年度の研究結果は以下のとおりである。

(1) 術前化学療法を実施した stage II-III の乳癌 180 例において、化学療法前の生検組織の FOXP3、CD8、IL17F 陽性リンパ球を定量した。FOXP3 陽性乳癌および CD8 陽性乳癌は陰性乳癌に比して病理学的完全寛解 (pCR) 率が高率であった。多変量解析では、FOXP3 と Ki67 の組み合わせが臨床的に有用な化学療法効果予測因子になることが示唆された。

(2) EGFR-TKI 耐性に関わる EGFRT790M 変異を検出する高感度コロニーハイブリダイゼーション法 (CH 法) を構築し、臨床検体の測定は 0.01% の感度で実施できた。マスアレイ法を用いた肺癌 EML-ALK 融合遺伝子の検出法を開発し、FFPE 検体での検出を可能にした。臨床検体での検討により、ALK 融合遺伝子陽性は、化学療法施行群において他因子発現群と予後に差異はなく、ALK 阻害剤に対する効果予測因子であることが示唆された。

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、毒性のバイオマーカーおよび規定因子の解析、(2) 細胞株などを用いた基礎における薬剤感受性/耐性規定因子の解明により、治療の個別化・最適化を確立し、治療成績の飛躍的向上を狙う。

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。

(3) KRAS 変異株とその変異を欠失させた KRAS 変異欠失株において、セツキシマブの暴露は、EGFR、MAPK、AKT のリン酸化に影響を与えなかった。Kras 変異株において、FasL、Trail への感受性が著明に低下していた。cetuximab と NK 細胞により誘導されるアポトーシスは、抗 Fas 抗体処理により、著明に減少した。ADCC は、Fas-FasL を介したアポトーシス誘導が作用機序のひとつであり、KRAS 変異はこれを抑制する可能性が示唆された。

(4) エルロチニブ抵抗性肺癌細胞株 H1650、PC9/GEF 細胞は、エルロチニブ処理でサバイビン発現量が低下せず、サバイビン阻害剤 YM155 との併用により、アポトーシスを誘導することに成功した。マウスを用いた実験においても、YM155 とエルロチニブの併用効果を認めた。

(5) エルロチニブ耐性肺がん細胞において、活性型 EGFR 遺伝子コピー減少とともに、 $\beta 1$ 、 $\alpha 2$ および $\beta 5$ インテグリンの発現と活性化が耐性に関与していることを見いだした。高播種スキルス胃癌は、低播種の細胞株と比べて NDRG1 発現が亢進しており、NDRG1 ノックダウンにより播種能が低下した。

(6) MKN45/MET 遺伝子増幅胃癌細胞から MET 阻害薬に対する獲得耐性モデルを作成し、耐性化機構を検討した。MET 遺伝子の Y1230H 変異およびコピー数増加が耐性に関与することが示唆された。これらの遺伝子変化は、阻害薬非存在下の過度の replication stress の原因となり S 期細胞周期停止を導くことにより、阻害薬への addiction の原因となることが示唆された。

(7) 新規 Pim-1 阻害薬である T1 は、Pim-1 選択的で強い阻害作用をもち、また FLT-ITD を発現するヒト急性骨髄性白血病細胞に *in vitro* および *in vivo* で有効性を示した。T1 は、マウスに対する毒性も許容範囲内であり、今後、抗悪性腫瘍薬としての開発に向けた検討をはじめた。

(8) 低酸素誘導因子(HIF) -1 はがんの悪性化に深く関与している basic loop-helix-loop 型の転写因子であり、HIF-1 ヘテロ二量体化を標的とした新しい抗がん剤の評価・開発に向けて、二分子蛍光相補法を用いた HIF-1 ヘテロ二量体化の評価系を構築した。

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

組織 FOXP3 陽性リンパ球が術前化学療法効果予測因子となった。EGFRT790M 変異検出のための高感度コロニーハイブリダイゼーション法、マスマレイ法を用いた EML-ALK 融合遺伝子検出法を開発した。Cetuximab による ADCC において、KRAS 変異は Fas-FasL を介したアポトーシスを抑制する。エルロチニブ抵抗性細胞においてサバイビン阻害剤併用効果を確認した。エルロチニブ耐性細胞で、 $\beta 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 5$ インテグリンの発現と活性化が耐性に関与した。MKN45/MET 遺伝子増幅胃癌細胞から MET 阻害薬耐性モデルを作成した。新規 Pim-1 選択的阻害薬 T1 は、FLT-ITD 発現ヒト AML 細胞に有効性を示した。二分子蛍光相補法を用いた HIF-1 ヘテロ二量体化の新規薬剤評価系を構築した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ekylongo, RC., Mukohara, T., Kataoka, Y., Kiyota, N., Fujiwara, Y., Minami, H. Mechanisms of acquired resistance to insulin-like growth factor 1 receptor inhibitor in MCF-7 breast cancer cell line. Invest New Drugs, 31(2):293-303, 2013.
- 2) Ogi, S., Fujita, H., Kashihara, M., Yamamoto, C., Sonoda, K., Okamoto, I., Nakagawa, K., Ohdo, S., Tanaka, Y., Kuwano, M., Ono, M. Sorting nexin 2-mediated membrane trafficking of c-Met contributes to sensitivity of molecular targeted drugs. Cancer Sci., 104(5):573-583, 2013
- 3) Shibata, T., Kan, H., Murakami, Y., Ureshino, H., Watari, K., Kawahara, A., Kage, M., Hattori, S., Ono, M., Kuwano,

- M. Y-box binding protein-1 (YB-1) contributes to both HER2/ErbB2 expression and lapatinib sensitivity in human gastric cancer cells. *Mol Cancer Therapeut.*, in press, 2013.
- 4) Otsuki, S., Nishimura, S., Takabatake, H., Nakajima, K., Takasu, Y., Yagura, T., Sakai, Y., Hattori, A., Kakeya, H. Chemical tagging of a drug target using 5-sulfonyl tetrazole. *Bioorg. Med Chem Lett.*, 23:1608-1611, 2013
 - 5) Katayama, K., Noguchi K, Sugimoto Y. FBXO15 regulates P-glycoprotein/ABCB1 expression through the ubiquitin-proteasome pathway in cancer cells. *Cancer Sci.*, in press, 2013.
 - 6) Arao, T., Ueshima, K., Matsumoto, K., Nagai, T., Kimura, H., Hagiwara, S., Sakurai, T., Haji, S., Kanazawa, A., Hidaka, H., Iso, Y., Kubota, K., Shimada, M., Utsunomiya, T., Hirooka, M., Hiasa, Y., Toyoki, Y., Hakamada, K., Yasui, K., Kumada, T., Toyoda, H., Sato, S., Hisai, H., Kuzuya, T., Tsuchiya, K., Izumi, N., Arii, S., Nishio, K., Kudo, M. FGF3/FGF4 amplification and multiple lung metastases in responders to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, in press, 2013.
 - 7) Makihara, RA., Makino, Y., Yamamoto, N., Yokote, N., Nokihara, H., Sekine, I., Ohe, Y., Tamura, T., Yamamoto, H. Gender difference in hematological toxicity among lung cancer patients receiving amrubicin monotherapy. *Jpn J Clin Oncol.*, 42(12):1187-1191, 2012.
 - 8) Makino, Y., Yamamoto, N., Sato, H., Ando, R., Goto, Y., Tanai, C., Asahina, H., Nokihara, H., Sekine, I., Kunitoh, H., Ohe, Y., Sugiyama, E., Yokote, N., Tamura, T., Yamamoto, H. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study on amrubicin and amrubicinol in Japanese patients with lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 69(4):861-869, 2012.
 - 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*, 30(4):1352-1360, 2012.
 - 10) Tomioka, H., Mukohara, T., Kataoka, Y., Ekyalongo, RC., Funakoshi, Y., Imai, Y., Kiyota, N., Fujiwara, Y., Minami, H. Inhibition of the mTOR/S6K signal is necessary to enhance fluorouracil-induced apoptosis in gastric cancer cells with *HER2* amplification. *Int J Oncol.*, 41(2):551-558, 2012.
 - 11) 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.
 - 12) 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- κ B pathway. *Int J Cancer*, 131(2):310-321, 2012.
 - 13) 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.*, 7(5):779-789, 2012.
 - 14) Tabara, K., Kanda, R., Sonoda, K., Kubo, T., Murakami, Y., Kawahara, A., Azuma, K., Abe, H., Kage, M., Yoshinaga, A., Tahira, T., Hayashi, K., Arao, T., Nishio, K., Rosell, R., Kuwano, M., Ono, M. Loss of activating EGFR mutant gene contributes to acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer cells. *PLoS ONE*, 7(7):e41017, 2012.
 - 15) Ureshino, H., Murakami, Y., Watari, K., Izumi, H., Kawahara, A., Kage, M., Arao, T., Nishio, K., Yanagihara, K., Kinoshita, H., Kuwano, M., Ono, M. N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1)

- promotes metastasis of human scirrhous gastric cancer cells through epithelial mesenchymal transition. *PLoS ONE*, 7(7):e41312, 2012.
- 16) Kishimoto, S., Tsunematsu, Y., Nishimura, S., Hayashi, Y., Hattori, A., Takeya, H. Tumescenamide C, an antimicrobial cyclic lipodepsipeptide from *Streptomyces* sp. *Tetrahedron*, 68:5572-5578, 2012.
 - 17) Kawanobe, T., Kogure, S., Nakamura, S., Sato, M., Katayama, K., Mitsushashi, J., Noguchi, K., Sugimoto, Y. Expression of human ABCB5 confers resistance to taxanes and anthracyclines. *Biochem Biophys Res Commun.*, 418(4):736-741, 2012.
 - 18) Tanizaki, J., Okamoto, I., Okabe, T., Sakai, K., Tanaka, K., Hayashi, H., Kaneda, H., Takezawa, K., Kuwata, K., Yamaguchi, H., Hatashita, E., Nishio, K., Nakagawa, K. Activation of HER family signaling as a mechanism of acquired resistance to ALK inhibitors in EML4-ALK-positive non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.*, 18(22):6219-6226, 2012.
 - 19) Hayashi, H., Okamoto, I., Kimura, H., Sakai, K., Nishimura, Y., Nishio, K., Nakagawa, K. Clinical Outcome of Thoracic Radiotherapy for Locally Advanced NSCLC with *EGFR* Mutations or *EML4-ALK*. *Anticancer Res.*, 32(10):4533-4537, 2012.
 - 20) Takeda, M., Okamoto, I., Sakai, K., Kawakami, K., Nishio, K., Nakagawa, K. Clinical outcome for EML4-ALK- positive patients with advanced non- small cell lung cancer treated with first-line platinum-based chemotherapy. *Annals of Oncol.*, 23(11):2931-2936, 2012.
 - 21) Okamoto, I., Nakagawa, K. EML4-ALK-targeted therapy for advanced non-small cell lung cancer: molecular and clinical aspects. *Cancer Sci.*, 103(8):1391-1396, 2012.
 - 22) 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.
 - 23) Tsunashima, R., Naoi, Y., Kishi, K., Baba, Y., Shimomura, A., Maruyama, N., Nakayama, T., Shimazu, K., Kim, S. J., Tamaki, Y., Noguchi, S. Estrogen receptor positive breast cancer identified by 95-gene classifier as at high risk for relapse shows better response to neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Lett.*, 324(1):42-47, 2012.
 - 24) Oda, N., Shimazu, K., Naoi, Y., Morimoto, K., Shimomura, A., Shimoda, M., Kagara, N., Maruyama, N., Kim, S. J., Noguchi, S. Intratumoral regulatory T cells as an independent predictive factor for pathological complete response to neoadjuvant paclitaxel followed by 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.*, 136(1):107-116, 2012.
 - 25) Miyake, T., Nakayama, T., Naoi, Y., Yamamoto, N., Otani, Y., Kim, S. J., Shimazu, K., Shimomura, A., Maruyama, N., Tamaki, Y., Noguchi, S. GSTP1 expression predicts poor pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in ER-negative breast cancer. *Cancer Sci.*, 103(5):913-920, 2012.
 - 26) 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. *Ann Oncol.*, 23(4):891-897, 2012.
 - 27) Fujita, N., Nakayama, T., Yamamoto, N., Kim, S. J., Shimazu, K., Shimomura, A., Maruyama, N., Morimoto, K., Tamaki, Y., Noguchi, S. Methylated DNA and Total DNA in Serum Detected by One-Step Methylation-Specific PCR Is Predictive of Poor Prognosis for Breast Cancer Patients. *Oncol.*, 83(5):273-282, 2012.
 - 28) Fujita, Y., Suda, K., Kimura, H., Matsumoto, K., Arao, T., Nagai, T., Saijo,

- N., Yatabe, Y., Mitsudomi, T., Nishio, K. Highly sensitive detection of EGFR T790M mutation using colony hybridization predicts favorable prognosis of patients with lung cancer harboring activating EGFR mutation. *J Thorac Oncol.*, 7(11):1640-1644, 2012.
- 29) Okamoto, W., Okamoto, I., Arao, T., Kuwata, K., Hatashita, E., Yamaguchi, H., Sakai, K., Yanagihara, K., Nishio, K., Nakagawa, K. Antitumor action of the MET tyrosine kinase inhibitor crizotinib (PF-02341066) in gastric cancer positive for MET amplification. *Mol Cancer Ther.*, 11(7):1557-1564, 2012.
- 30) Sakai, K., Okamoto, I., Takezawa, K., Hirashima, T., Kaneda, H., Takeda, M., Matsumoto, K., Kimura, H., Fujita, Y., Nakagawa, K., Arao, T., Nishio, K. A novel mass spectrometry-based assay for diagnosis of EML4-ALK-positive non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.*, 7(5):913-918, 2012.
- 31) Matsuoka, H., Arao, T., Makimura, C., Takeda, M., Kiyota, H., Tsurutani, J., Fujita, Y., Matsumoto, K., Kimura, H., Otsuka, M., Koyama, A., Imamura, CK., Tanigawara, Y., Yamanaka, T., Tanaka, K., Nishio, K., Nakagawa, K. Expression changes in arrestin $\beta 1$ and genetic variation in catechol-O-methyltransferase are biomarkers for the response to morphine treatment in cancer patients. *Oncol Rep.*, 27(5):1393-1399, 2012.
- 32) 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.
- 33) 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):763-767, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得
(予定を含む)
 1. ソラフェニブの効果予測方法、西尾和人他3名、特許公開2012-249633、2012年12月20日公開
 2. EML4-ALK融合遺伝子の好感度検出方法、西尾和人、外5名、特許公開2012-100628、2012年5月13日公開
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

MKN45 *MET* 遺伝子増幅胃癌細胞からMET阻害薬（PHA-665752、GSK1363089）に対する獲得耐性モデルを作成し、耐性化機構を検討した。その結果、*MET* 遺伝子のY1230H変異およびコピー数増加が耐性に関わっていることが示唆された。さらに、これらの遺伝子変化は、阻害薬非存在下の過度のreplication stressの原因となりS期細胞周期停止を導くことにより、阻害薬への”addiction”の原因となることが示唆された。

A. 研究目的

Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors (RTK-Is) を含む分子標的薬によりがん治療は大きく改善しが、その耐性も問題となる。我々の研究の目的はRTK-Isの獲得耐性機構を明らかにし、耐性克服方法を開発することである。今年度は、昨年度開始したMET阻害薬に対する耐性機構を明らかにすることを目的とした研究を推進した。さらに、同研究のため作成した獲得耐性モデルが、MET阻害薬に依存して増殖するという興味深い現象が観察されたため、その分子機構を解明することを目的に研究を行った。

B. 研究方法

我々は先行研究において *MET* 遺伝子に増幅をもつMKN45胃癌細胞株はMET阻害薬に高感受性を示すことを示した (Kataoka Y et al, Invest New Drugs, 2011) が、この細胞株をMET阻害薬であるPHA665752 (PHA) やGSK1363089 (GSK) に長期間曝露することによって、獲得耐性モデル (MKN45-PR、MKN45-GR) を樹立した。親株および耐性株の細胞増殖はMTS assayで評価し、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。*MET* 遺伝子exon 19の塩基配列および遺伝子コピー数はそれぞれdirect sequence法、定量的PCRで決定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、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

Western-blot法では、耐性株であるMKN45-PRおよびMKN45-GRにおけるMETタンパク発現量が親株に比べて高いことが分かった。それと一貫して、これら耐性株での遺伝子コピー数は親株に比して2倍以上増加していた。MKN45-PRの一部のalleleで検出されたMET遺伝子exon 19のY1230H変異はMKN45-GRでは観察されな

った。

さらに、耐性株では、それぞれの中量量のMET阻害薬存在下において増殖速度が薬物非存在下よりもむしろ促進される現象 (“drug addiction”) が観察された。耐性株ではMET阻害薬存在下でS期に細胞周期が分布する一方でBrdUの取り込みが亢進していないことから、この現象の本態はS期細胞周期停止であることが示唆された。これらの結果から、我々はMET阻害薬非存在下では、上記の *MET* 遺伝子の変化が過度のreplication stressの原因となり、その結果DNA damage responseが励起するためにS期細胞停止を来すと仮説を立てた (図1)。それを裏付けるためにリン酸化型ATR、Chk1、p53およびp21の発現を検討したが、耐性株ではMET阻害薬非存在下ではこれらが親株より高いことが分かった。

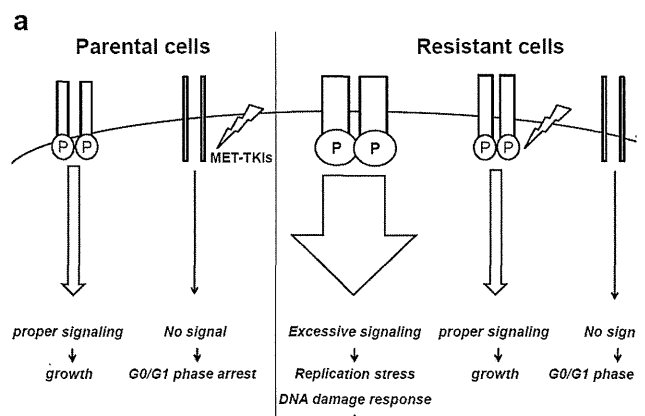


図1. MET阻害薬”addiction”のメカニズム

更にMKN45-PRをPHA非存在下に継代培養すると、PHAに対する”drug addiction”は部分的に解除されるものの、耐性は維持されることが分かった。これらの株では *MET* 遺伝子のコピー数は減少し、Y1230Hの変異は保たれることから、PHAに対する”drug addiction”はMET遺伝子コピー数に依存することが示唆された。

D. 考察

MKN45-PRにみられたMET遺伝子のY1230H変異や両耐性株にみられたMET遺伝子のコピー数増加は、他の細胞株を用いたMET阻害薬獲得耐性モデルでも報告されており、普遍的な現象である可能性が示唆される。これらの遺伝子変化はMET阻害薬に対する生化学的な耐性を説明するのみならず、過度のreplication stressの原因となり、その結果S期停止を導くと考えられた。この現象が臨床でも観察されるとすれば、腫瘍が耐性を獲得し増大した後に薬剤投与を中止することにより病勢がむしろ沈静化することが予想される。また今回の我々のMET阻害薬耐性モデルでは点突然変異であるY1230Hは不可逆的である一方、コピー数の増加は可逆的であることが示唆された。同様の知見はimatinib耐性のCML細胞株でも示されており、獲得耐性において共通にみられる現象の可能性がある。

E. 結論

MET阻害薬に対する獲得耐性には、MET遺伝子のY1230H変異およびコピー数増加が関わっていることが示唆された。これらの遺伝子変化は同時に、阻害薬非存在下の過度のreplication stressの原因となり、その結果S期停止を導くことにより、阻害薬への”drug addiction”の原因となることが示唆された。これらMET遺伝子の変化の内、Y1230H変異はMET阻害薬の曝露から解放しても不可逆的である一方コピー数増加は可逆的であ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) Funakoshi Y, Mukohara T, Tomioka H, Ekyalongo RC, Kataoka Y, Inui Y, Kawamori Y, Toyoda M, Kiyota N, Fujiwara Y, Minami H. Excessive MET signaling causes acquired resistance to and addiction to MET inhibitors in MKN45 gastric cancer cell line. *Investigational New Drugs*, 2013;in press
- (2) Ekyalongo RC, Mukohara T, Kataoka Y, Kiyota N, Fujiwara Y, and Minami H. Mechanisms of acquired resistance to insulin-like growth factor 1 receptor inhibitor in MCF-7 breast cancer cell line. *Invest New Drugs* 2013;31:293-303.
- (3) Tomioka H, Mukohara T*, Kataoka Y, Ekyalongo RC, Funakoshi Y, Imai Y, Kiyota N, Fujiwara Y, Minami H. Inhibition of mTOR-S6K signal is necessary to enhance fluorouracil-induced apoptosis in HER2-amplified gastric cancer cells. *Int J Oncol* 2012 ;41:551-558.

- (4) 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* 30 (4): 1352-1360, 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

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

「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

昨年度までに、KRAS変異は、セツキシマブのEGFRシグナルの直接阻害効果を減弱させるのみでなく、ADCC誘導を抑制することで治療抵抗性を付与する可能性を示した。本年度は、KRAS変異による、セツキシマブ治療抵抗性メカニズムの検討を進めると同時に、同じEGFR抗体であるパニツムマブとの違いを検討した。KRAS変異株とその変異を欠失させたKRAS変異欠失株において、セツキシマブの暴露は、いずれの株においてもEGFR、MAPK、AKTのリン酸化に影響を与えなかった。アポトーシス誘導サイトカインであるFas ligand (FasL) およびTRAILの感受性を、両細胞株において比較したところ、FasL、Trailともに、Kras変異株において、その感受性が著明に低下することを見出した。さらに、cetuximabとNK細胞により誘導されるアポトーシスは、抗Fas抗体を同時に処理することにより、著明に減少することを見出した。以上より、ADCCは、Fas-FasLを介したアポトーシス誘導が作用機序のひとつであり、KRAS変異は、その細胞死誘導を抑制する可能性が示唆された。さらに本年度は、同じEGFR抗体である、パニツムマブとの比較を行い、両抗体ともに細胞の直接増殖抑制効果は弱いものの、ADCC誘導能は、セツキシマブが高い事を見出した。

A. 研究目的

大腸がんのKRAS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示されているが、その機序は十分に解明されていない。特にセツキシマブの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。また、同じ標的を持つ抗体においてもADCC誘導能、シグナル抑制の違い等から、差別化をおこない、これらにより、各抗体医薬に適した患者の層別化の可能性を検討する。

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手法を用いて欠損させた株(Hkh2(KRAS -/wt), DKO-4(KRAS -/wt))を用いる。

・抗体薬、およびその他の試薬

セツキシマブ（抗EGFR抗体、IgG1）
パニツムマブ（抗EGFR抗体、IgG2）
抗Fasリガンド中和抗体
抗TRAIL中和抗体

・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。

・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を、EGFR、ERK、AKT、およびそのリン酸化抗体を用いて、ウエスタンブロットティングにより確認した。

（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

【前年度までの成果】

KRAS変異株HCT-116、DLD-1と、そのKRAS変異欠損株Hkh2、DKO-4を用いて、実験を行った。短時間（4時間）のカルセインアッセイによるパーフォリン依存的なADCCの評価では、KRAS変異株と変異欠失株で細胞障害に差は認められなかったが、パーフォリン抑制下に

における（CMA添加）長時間（24hr）のWST-8アッセイにおいては、ADCC誘導がKRAS変異株において有意に減弱することを示した。またアポトーシスの誘導は、パーフォリン抑制下において、KRAS変異欠失株においてのみ認められた。

【本年度の成果】

・EGFRシグナルに及ぼす影響

それぞれの細胞株において、24時間セツキシマブ暴露後のEGFR、ERK、AKT、及びそのリン酸化蛋白の発現を、ウェスタンブロッティングにより検討した。KRAS変異株において、リン酸化ERK、リン酸化AKTの発現が増加する傾向を認めたが、セツキシマブの暴露による発現変化は、いずれの分子にも認められなかった（図1）。セツキシマブのEGFRシグナルに対する直接抑制効果は、小さいことが示唆された。

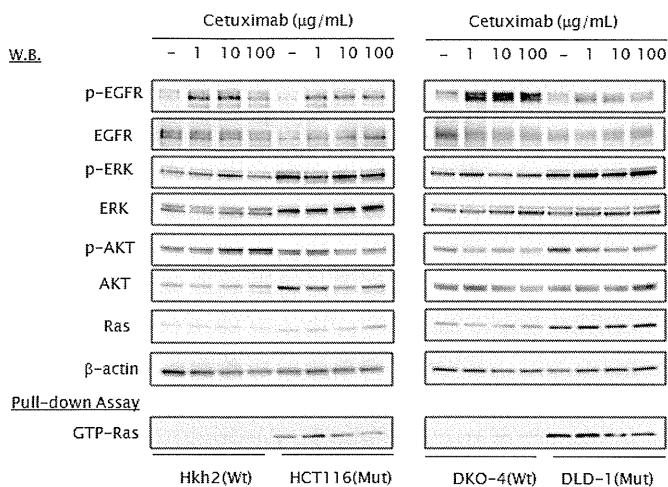


図1. セツキシマブのEGFRシグナルに及ぼす影響

・アポトーシス誘導サイトカインに対する感受性

アポトーシス誘導サイトカインである、FasLとTRAILの感受性をそれぞれの細胞株で検討した。KRAS遺伝子変異株において、これらのサイトカインの感受性が低下していた（図2）。さらに、セツキシマブによるADCC誘導が、抗Fas抗体、抗TRAIL抗体により阻害されるか検討した。抗TRAIL抗体は、ADCCの誘導に影響しないが、抗Fas抗体の処理によりADCCは減弱し（図3）、有意なアポトーシスの誘導も認められなくなることを確認した（図4）。以上の結果は、FasLによる細胞死誘導が、セツキシマブの誘導するADCCの作用機序のひとつであり、KRAS遺伝子変異は、この細胞死誘導を抑制することが示唆された。

・抗EGFR抗体セツキシマブとパニツムマブの比較

これまでの研究、および他の研究から、抗体医薬の抗腫瘍効果の作用機序の一つとしてADCCが重要であり、セツキシマブのKRAS遺伝子変異に対する治療抵抗性も、ADCCに関わることを示してきた。同じ分子を標的とする抗体医薬であっても、ADCC活性の強さ、標的分子の

抑制の程度には差異があると考えられる。

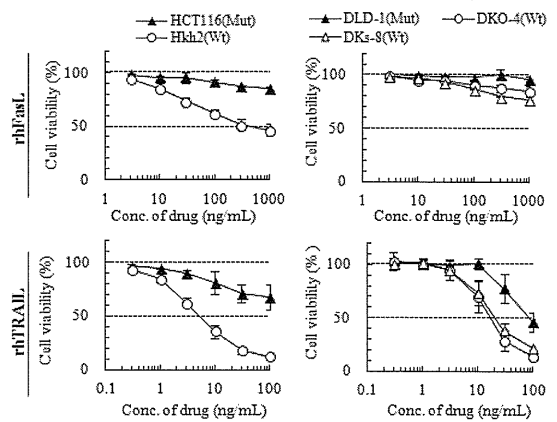


図2. FasLとTRAILの各種細胞株における増殖抑制効果

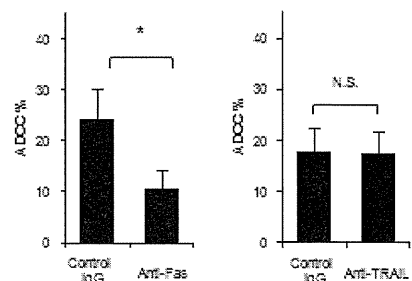


図3. 抗Fas抗体と抗TRAIL抗体のADCCへの影響

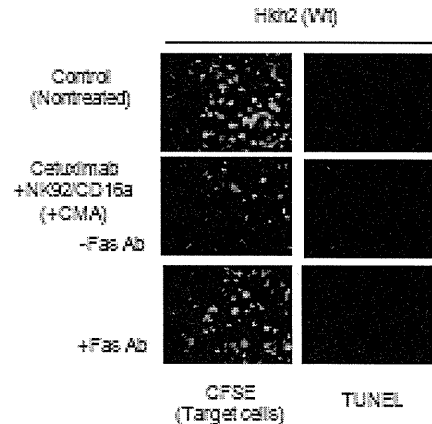


図4. 抗Fas抗体のセツキシマブ誘導アポトーシスにおける影響

しかしながら、現時点では、作用の違いによる抗体医薬の使い分けは行われていない。例えば、ADCC活性の強い個体に対しては、ADCC誘導能の強い抗体を使用する、などである（別研究特許；アメリカ合衆国特許出願（出願番号61/241, 066））。

今回、IgG1抗体であるセツキシマブとIgG2抗体であるパニツムマブの比較を行った。両抗体ともにKRAS遺伝子変異の有無にかかわらず、直接の細胞増殖抑制効果はほとんど認められなかった（図5）。また、パニツムマブには、ADCC活性がほとんど認められなかった（図6）。

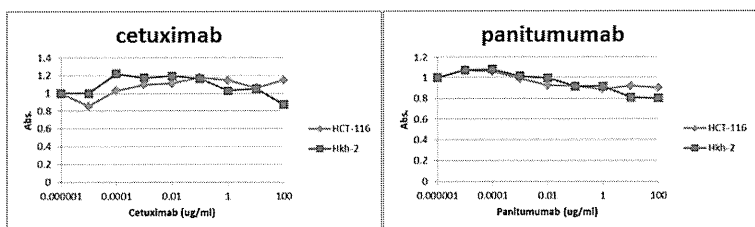


図5. セツキシマブ、パニツムマブの細胞増殖抑制活性

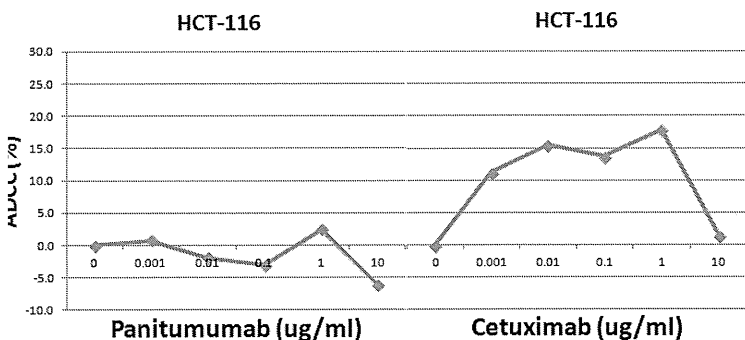


図6. セツキシマブ、パニツムマブのADCC活性

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。これまでの研究から、我々は、KRAS遺伝子変異は、セツキシマブによるADCCに対して抑制的に働くことを示してきた。これは、特にFas-FasLによるアポトーシスシグナルを、KRAS遺伝子変異がブロックすることにより生じる可能性を示した。これらの結果、および抗体による直接的な細胞障害活性が非常に弱いことは、抗体医薬の抗腫瘍効果の作用機序として、ADCCが重要であることを示唆している。抗体のADCC誘導能の差異を明らかにすることで、ADCC活性の個人差を明らかにすることで、各抗体医薬に適した患者の層別化が可能になる可能性がある。

E. 結論

KRAS遺伝子の変異は、Fas-FasLによるアポトーシスシグナルに対して抑制的に作用することで、ADCCに抵抗性を付与すると考えられた。ADCC誘導能は、セツキシマブがパニツムマブより強く、同じ標的を有する抗体においても、ADCC誘導能の違いを明らかにすることで、同標的を持つ各抗体の差別化が可能であると考えられた。

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

- Minakata K, Takahashi F, Nara T, Hashimoto M, Tajima K, Murakami A, Nurwidya F, Yae S, Koizumi F, Moriyama H, Seyama K, Nishio K, Takahashi K. Hypoxia induces gefitinib resistance in non-small-cell lung cancer with both mutant and wild-type epidermal growth factor receptors. *Cancer Sci.*, 103(11): 1946-54, 2012.
- Kondo S, Ueno H, Hashimoto J, Morizane C, Koizumi F, Okusaka T, Tamura K. Circulating endothelial cells and other angiogenesis factors in pancreatic carcinoma patients receiving gemcitabine chemotherapy. *BMC Cancer*. 2012 Jun 25;12:268. doi: 10.1186/1471-2407-12-268.
- Yunokawa M, Koizumi F, Kitamura Y, Katanasaka Y, Okamoto N, Kodaira M, Yonemori K, Shimizu C, Ando M, Masutomi K, Yoshida T, Fujiwara Y, Tamura K. Efficacy of everolimus, a novel mTOR inhibitor, against basal-like triple-negative breast cancer cells. *Cancer Sci.*, 103(9):1665-71, 2012.
- 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):727-32, 2012.
- 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 lung cancer cells. *Am J Cancer Res.*, 1(7):823-33, 2011.
- 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.
- Arao T, Matsumoto K, Furuta K, Kudo K, Kaneda H, Nagai T, Sakai K, Fujita Y, Tamu

- ra 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.
8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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 R2A and 3A polymorphisms predict clinical outcome of trastuzumab in both neoadjuvant and metastatic settings in patients with HER2-positive breast cancer. *Ann Oncol.*, 22(6):1302-7, 2011.
 12. Katanasaka Y, Ishii T, Asai T, Naitou H, Maeda N, Koizumi F, Miyagawa S, Ohashi N, Oku N. Cancer antineovascular therapy with liposome drug delivery systems targeted to BiP/GRP78. *Int J Cancer.*, 127(11):2685-98, 2010.

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

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

がん薬物療法の適正化に関してEGF受容体（EGFR）チロシンキナーゼ耐性獲得の新しい機序を肺がん細胞で提示するとともに、腹膜播種やリンパ節転移および血管新生に関与するN-myc下流遺伝子の役割について胃がんで検討した。

A. 研究目的

薬物療法の適正化について、耐性がん細胞の出現の分子機序を基盤にして、耐性獲得へ関連する分子の有用性を明らかにする。さらに耐性がんだけでなく、がんの悪性進展を担う転移や血管新生に関与する新しい機序と治療に有用な分子を提示する。

B. 研究方法

(1) EGFR-チロシンキナーゼ阻害剤（EGFR-TKI）やマルチキナーゼ阻害剤に対する耐性株をヒト癌細胞から樹立し、耐性獲得の分子機序を感受性の親細胞株と対比しながら明らかにする。さらに、Y-ボックス結合タンパク質-1（YB-1）がEGFRファミリーのうち各れの発現を特異的に調節しているかを、YB-1 siRNAを用いて検討した。同時にラパチニブに対する感受性について細胞増殖能で測定した。

(2) 増殖因子受容体の膜発現を制御する膜輸送タンパク質Sorting Nexin（SNX）ファミリーの中で、c-Metの発現を特異的に調節するSNXを特異的なsiRNAでノックダウンすることによって探索し、各れの分子標的薬の感受性が変化するか否かを検討した。

(3) 分子標的薬の感受性を変化させる新規分子については、患者の治療効果に影響を与えるか否かを、外科切除標本や生検資料を用いた免疫組織及び細胞染色法で検討した。

(4) 腹膜播種やリンパ節転移や血管新生に関連する新しい分子機序を明らかにするために、転移能や血管新生能が亢進したがん細胞株と低転移能を示す親がん細胞株を対比させた。in vitro とin vivo実験系で血管新生や転移に関与する分子の役割を明らかにした。

（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。さらには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

本年度は以下の研究結果を得ることができた。

(1) エルロチニブ耐性を示すヒト肺がん細胞を対象に、耐性獲得の機序を検討した。その結果、活性型EGFR遺伝子コピーが減少しているために耐性を示すことが観察された。さらに、 $\beta 1$ 、 $\alpha 2$ および $\beta 5$ インテグリンの発現と活性化が亢進しているために、耐性を獲得している新しい機序を発見した。後者の機序と関連して、エルロチニブ治療に抵抗性を示した肺癌患者で $\beta 1$ や $\alpha 5$ の発現亢進が観察された。

(2) SNXファミリー遺伝子の中でSNX2をノックダウンすることによって、c-Metの膜発現が特異的に減少することが見出された。その結果、EGFR-TKIに高感受性を示し、Met-TKIに低感受性を示した。さらにSNX2ノックダウンによる活性型Met膜発現の消失はエンドソーム/リソソーム阻害剤によって回復された。

(3) YB-1はコールドショックドメインを持つDNA結合タンパク質である。ヒト胃がん細胞株のYB-1発現をノックダウンするとEGFRファミリーの中でHER2/ErbB2の発現を特異的に抑制し、ラパチニブに対する感受性を低下させた。さらにYB-1の核内発現とHER2発現が有意に相関することを、胃癌患者の外科切除標本で示した。

(4) スキルス胃癌由来で腹膜播種能や腫瘍増大能が高播種細胞では、低播種の細胞株と比べてN-myc downstream regulated gene 1（NDRG1）の発現が亢進していることが見出された。NDRG1のノックダウンによって増殖能の減少とともに、腹膜播種が抑制された。さらにEMT関連のE-カドヘリンの発現上昇と転写因子Snai

il発現の低下が見られた。

D. 考察

EGFR-TKIによる薬物療法に対する新しい耐性機序を見出すことは薬物療法の適正化に貢献する所は大きい。本研究で活性型変異EGFRコピーの減少やインテグリンβ1の発現上昇と活性化を新たに発見した。これらのバイオマーカーが有用であるか否かは臨床腫瘍での検討が必要である。さらに胃癌においてYB-1の核内発現がHER2/ErbB2の発現との有意な相関を見出した。YB-1発現がハーセプチンやラパチニブなどの治療効果と関連するか否かは今後の課題である。他方、スキルス胃癌が増殖能や浸潤/転移能などを含め極めて悪性度の高い理由として、EMTは重要な1因子と考えられる。NDRG1-EMTが胃癌の悪性進展に関与するか否か、またがん創薬の標的分子となるか否かを今後明らかにしていきたい。

E. 結論

肺がん細胞において、インテグリン・1の発現上昇と活性化がEGFR-TKI耐性獲得へ関与すること、活性型c-Metの膜発現に膜輸送を調節するSNX2が関与していることを示した。さらに、胃がん細胞において、YB-1がHER2発現を特異的に制御していること、その核内発現が胃癌患者の癌細胞でのHER2発現と有意に相関することを示した。また、スキルス胃がん細胞の腹膜播種にNDRG1-Snail-EMTが関与することを示唆した。

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. 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-κB pathway. *Int. J. Cancer*, 131 : 310-321, 2012.
2. 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 : 122-127, 2012.

3. 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.*, 7 : 779-789, 2012.
4. Tabara, K., Kanda, R., Sonoda, K., Kubo, T., Murakami, Y., Kawahara, A., Azuma, K., Abe, H., Kage, M., Yoshinaga, A., Tahira, T., Hayaishi, K., Arao, T., Nishio, K., Rosell, R., Kuwano, M., Ono, M. Loss of activating EGFR mutant gene contributes to acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer cells. *PLoS ONE*, 7: e41017, 2012.
5. Ureshino, H., Murakami, Y., Watari, K., Izumi, H., Kawahara, A., Kage, M., Arao, T., Nishio, K., Yanagihara, K., Kinoshita, H., Kuwano, M., Ono, M. N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) promotes metastasis of human scirrhous gastric cancer cells through epithelial mesenchymal transition. *PLoS ONE*, 7 : e41312, 2012.
6. Ogi, S., Fujita, H., Kashihara, M., Yamamoto, C., Sonoda, K., Okamoto, I., Nakagawa, K., Oshido, S., Tanaka, Y., Kuwano, M., Ono, M. Sorting nexin 2-mediated membrane trafficking of c-Met contributes to sensitivity of molecular targeted drugs. *Cancer Sci.*, 104 : in press, 2013.
7. Shibata, T., Kan, H., Murakami, Y., Ureshino, H., Watari, K., Kawahara, A., Kage, M., Hattori, S., Ono, M., Kuwano, M. Y-box binding protein-1 (YB-1) contributes to both HER2/ErbB2 expression and lapatinib sensitivity in human gastric cancer cells. *Molec. Cancer Therapeut.*, in press, 2013.

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 服部 明 京都大学大学院薬学研究科・准教授

研究要旨

低酸素誘導因子(HIF)-1はがんの悪性化に深く関与しているbasic loop-helix-loop型の転写因子である。本研究では、HIF-1ヘテロ二量体化を標的とした新しい抗がん剤の評価・開発に向けて、二分子蛍光相補法を用いたHIF-1ヘテロ二量体化の評価系の構築を行った。

A. 研究目的

低酸素誘導因子(hypoxia-inducible factor: HIF)-1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。HIF-1はbasic loop-helix-loop型転写因子であり、 α および β サブユニットが各分子内に存在するPAS (Per ARNT Sim)ドメインを介して結合したヘテロ二量体構造をとっている。HIF-1の活性化にはヘテロ二量体化が必要であることから、本研究では、HIF-1ヘテロ二量体化を標的とした新しい抗がん剤の評価・開発に向けたハイコンテントスクリーニング系の構築を行った。前年度までの検討の結果、サンゴ由来の蛍光タンパク質Kusabira-Green (KG)を用いた二分子蛍光相補法がHIF-1ヘテロ二量体化の特異的な検出に有用であることが示された。そこで、本年度は、HIF-1阻害剤のハイコンテントスクリーニング用細胞株の作成ならびにそれを用いたスクリーニング系の構築・評価を行った。

B. 研究方法

HIF-1各サブユニット(HIF-1 α および β)とサンゴ由来蛍光タンパク質 Kusabira-Green (KG)断片(KGNおよびKGC)との融合タンパク質(HIF-1 α -KGN および KGC-HIF-1 β)を Doxycycline (Dox)によって発現制御可能な発現ベクターをtTA/CHO-K1細胞に導入した。薬剤(Blasticidin S/Zeocin/Hygromycin B)選択によって取得した各細胞クローンのDox除去後のKG回復能および遺伝子発現誘導能を蛍光顕微鏡観察ならびにWestern blot解析によって検討した。また、KG蛍光回復におけるPASドメイン相互作用の必要性は、共免疫沈降法やKG断片の融合していないPASドメインの過剰発現による競合実験により確認した。

(倫理面への配慮)

組換えDNA実験内容については京都大学内委員会にて承認されている。

C. 研究結果

スクリーニング用細胞株の作製にあたり、tTAプロモーターの下流にHIF-1 α -KGN遺伝子を挿入したプラスミド(pTRE-1 α KGN : Zeocin耐性遺伝子含有)を作製し、これをtTAプロモーターの下流にKGC-HIF-1 β 遺伝子を挿入したpTRE-KGC1 β (Hygromycin耐性遺伝子含有)とともにtTA遺伝子を導入済のtTA/CHO-K1細胞に導入した。マーカー薬剤(Blasticidin S, Zeocin, Hygromycin)に加えてDoxを添加した培地を用いて細胞をスクリーニングした結果、約150株のクローンを取得することができた。これらの性状解析の結果、ほとんどのクローンがDox除去による蛍光再構成能を示し、目的の細胞株(1 α KGN-KGC1 β /CHO-K1)を得ることができた。そして各クローンの蛍光強度などを比較検討した結果、1 α KGN-KGC1 β /CHO-K1細胞クローン41を以下の解析で使用することにした。

1 α KGN-KGC1 β /CHO-K1細胞クローン41の性状を詳細に解析した結果、本クローンではDox除去後48時間後から核内にKGの蛍光像が認められ、このとき確かに各融合タンパク質の発現もDox除去によって誘導されていることが明らかとなった。また、この時の蛍光がHIF-1のPASドメインを介した複合体形成によるものであることを確認するため、共免疫沈降実験を行った結果、確かにHIF-1 α -KGNとKGC-HIF-1 β との相互作用が確認された。さらにKG断片を欠失させたHIF-1 α もしくはHIF-1 β のPAS領域周辺をクローン41に一過性に発現させると蛍光回復が著しく阻害された。これらの結果から、クローン41ではDox除去によって、HIF-1 α -KGNとKGC-HIF-1 β がPASドメインを介して特異的に相互作用することでKGの再構成が誘導されることが明らかになった。

次に、1 α KGN-KGC1 β /CHO-K1細胞クローン41のHIF-1阻害剤ハイコンテントスクリーニング系への応用を試みた。Doxを含まない培地条件で96穴プレートに播種した細胞は、24時間後では蛍光を発していなかったが、48時間後にはハイコンテントリーダー Cellomics Array Scanを用いた解析に十分なKGの蛍

光シグナルが得られることが分かった。そこでスクリーニングの実施に当たっては、細胞播種の翌日に試験化合物を培養液中に添加して、その24時間後のKG蛍光像を取得することとした。次に、本HIF-1二量体化阻害剤スクリーニング系の汎用性を評価するため、化合物ライブラリーを用いた検証実験を行った。約1,200種の化合物について10 μ Mの濃度でHIF-1二量体化阻害能を検討した結果、7個の化合物が70 %以上のKG蛍光回復能阻害効果を示した。

D. 考察

本研究にて構築した1 α KGN-KGC18/CHO-K1細胞クローン41を利用したHIF-1ヘテロ二量体化ハイコンテンツスクリーニング系の汎用性は本研究によって十分示された。しかしながら、本系でのヒット化合物の特異性を評価するためには、類似のシステムを利用した他のタンパク質間相互作用解析法の併用によるデータ精査あるいは新たな二次評価系の構築が必要である。

E. 結論

本研究の結果、1 α KGN-KGC18/CHO-K1細胞クローン41はHIF-1ヘテロ二量体化の評価に資する新しいスクリーニング系になりうることが示された。今後の化合物スクリーニングを展開することでHIF-1ヘテロ二量体化を標的とした新しいタイプの抗がん剤の開発へとつながることが期待される。

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) Kishimoto, S., Tsunematsu, Y., Nishimura, S., Hayashi, Y., Hattori, A., Takeya, H. Tumescenamide C, an antimicrobial cyclic lipodepsipeptide from *Streptomyces* sp. Tetrahedron, 68:5572-5578, 2012.

2) Otsuki, S., Nishimura, S., Takabatake, H., Nakajima, K., Takasu, Y., Yagura, T., Sakai, Y., Hattori, A., Takeya, H. Chemical tagging of a drug target using 5-sulfonyl tetrazole. Bioorg. Med. Chem. Lett., 23:1608-1611, 2013.

3) 大野裕司、服部 明、掛谷秀昭. 新しいがん分子標的としてのヒトC7orf24/ γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ. 日本臨床社, 70, 723-727, 2012.

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

新規Pim-1阻害薬であるT1は、Pim-1選択的で強い阻害作用をもち、またFLT-ITDを発現するヒト急性骨髄性白血球細胞に*in vitro*および*in vivo*で有効性を示した。T1は、マウスに対する毒性も許容範囲内であることから、今後、抗悪性腫瘍薬としての開発が期待される。

A. 研究目的

Pim-1はセリンスレオニンキナーゼであり、細胞周期やアポトーシスに関与するタンパク質をリン酸化することで、がん細胞の増殖の促進、抗アポトーシスなどに働く。白血病、リンパ腫、前立腺がんなどで、Pim-1の高発現が報告されている。特に、FLT3の活性型変異体であるFLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD) を持つ急性骨髄性白血病で、その下流のPim-1が活性化していることが知られている。このためPim-1はがん治療の標的となると考えられる。本研究では、新規Pim-1阻害薬の作用について検討した。

B. 研究方法

8種のPim-1阻害薬（T1とその誘導体であるT2～T8）を実験に用いた。FLT-ITDを発現するヒト急性骨髄性白血球細胞株MV4-11を含む8種の血液腫瘍細胞株と、7種のヒト固形がん細胞株を実験に用いた。また、MV4-11細胞にMDR1遺伝子あるいはBCRP遺伝子を導入してMV4-11/MDR細胞およびMV4-11/BCRP細胞を樹立し、実験に用いた。各細胞株のP-糖タンパク質とBCRPの発現は、western blotとFACSで確認した。化合物のキナーゼ阻害試験、細胞増殖阻害試験などには、SuperGen社の開発したPim-1阻害薬であるSGI-1776をコントロールとして用いた。T1の抗腫瘍作用をみる実験では、培養したMV4-11細胞10⁷個をマトリジェルと混合してBALB/cヌードマウスの背部皮下に移植した。移植後14日目に、腫瘍の大きさが100mm³を超えたことを確認して治療を開始した。T1治療群のマウスには、50mg/kgあるいは35mg/kgのT1を週に3回、3週間腹腔内投与した。コントロールとして、シタラビン75mg/kgを週に3回腹腔内投与した。経時的に腫瘍体積とマウスの体重を測定した。

（倫理面への配慮）

本研究における遺伝子組換え実験は、所属機関の遺伝子組換え実験安全要綱に従って行なわれた。本研究

における動物実験は、所属機関の動物実験規程に従い、使用する動物を最少限とする、動物に対する苦痛を最小限にする、などの配慮のもとに行なわれた。

C. 研究結果

Pim-1阻害薬T1は、*in vitro*でのPim-1のkinase阻害のIC₅₀は3 nMであり、SGI-1776と同等の強いPim-1阻害活性を示した。T1のMV4-11細胞に対する細胞増殖阻害のIC₅₀は10 nMであったが、他の白血球細胞や固形がん細胞に対する細胞増殖阻害のIC₅₀は0.6～13 μMであった。これにより、T1がFLT-ITDを発現する白血球細胞の増殖を強く阻害することが示された。

MV4-11細胞をヌードマウスの皮下に移植してT1の抗腫瘍効果を調べた。治療開始から23日目の治療なし群と比較した腫瘍体積（T/C%）は、T1の50mg/kg投与群で29%、T1の35mg/kg投与群で42%であり、T1投与による有意な腫瘍体積の減少が示された。一方、シタラビン75mg/kg投与群のT/Cは60%であった。T1の50mg/kg投与群ではマウスの体重が最大で約10%減少したが、T1の35mg/kg投与群ではマウスの体重減少はほとんどみられなかった。

P-糖タンパク質発現細胞であるMV4-11/MDRは、T1に16倍の耐性を示した。また、BCRP発現細胞であるMV4-11/BCRPには、2倍の耐性を示した。Pim-1はP-糖タンパク質、BCRPをリン酸化することが報告されているが、T1は細胞のP-糖タンパク質、BCRPの発現には影響を与えなかった。

D. 考察

Pim-1は、がん細胞の増殖の促進、抗アポトーシスなどに働くこと、種々の腫瘍細胞で高発現していることなどから、がん治療の標的として注目されている。現在までにいくつかのPim-1キナーゼ阻害薬が報告されているが、その中で最も開発の進んだSGI-1776は、第1相試験での心毒性の発現により開発中止となっている。本研究により、T1がFLT-ITDを発現する急性骨

髓性白血病細胞に *in vitro* および *in vivo* で有効であることが示されたため、今後は、この化合物及びその誘導体の生物活性と抗腫瘍効果についてさらに検討していく。

E. 結論

本研究により、新規Pim-1阻害薬であるT1が、強いPim-1阻害作用をもち、またFLT-ITDを発現する急性骨髄性白血病細胞に *in vitro* および *in vivo* で有効であることが示された。T1は、マウスに対する毒性も許容範囲内であることから、今後、白血病治療薬としての開発が期待される。

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. 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.
2. Shofuda, T., Kanematsu, D., Fukusumi, H., Yamamoto, A., Bamba, Y., Yoshitatsu, S., Suemizu, H., Nakamura, M., Sugimoto, Y., Furue, M., Kohara, A., Akamatsu, W., Okada, Y., Okano, H., Yamasaki, M., Kanemura, Y. Human decidua-derived mesenchymal cells is a promising source for generation and cell banking of human induced pluripotent stem cells. *Cell Medicine*, in press.
3. Katayama, K., Noguchi K, Sugimoto Y. FBX015 regulates P-glycoprotein/ABCB1 expression through the ubiquitin-proteasome pathway in cancer cells. *Cancer Sci*, 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