

201313054A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田村 友秀

平成26(2014)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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田村 友秀

平成26（2014）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. 分子標的薬剤の原理の証明と生物学的マーカーに関する臨床研究-----	6
田村 友秀	
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-----	11
西尾 和人	
4. 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--	15
杉本 芳一	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	17
--------------------------	----

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

本年度の研究成果は以下のとおりである。① 胃癌、食道癌の臨床検体において FGFs、FGFR1-4 の遺伝子増幅を認め、これらの異常をもつ細胞株は FGFR 阻害剤に高い感受性を示すことを示した。② 抗体治療効果に関わる ADCC 活性の個体差の臨床評価のため、採血と同時に白血球を刺激、一定時間自動保温する持ち運び可能なシステムを開発した。③ EGFR 阻害剤による急性肺障害研に関連する遺伝子多型として抽出した *ABCBI* (P-gp) の rs28364274 の機能解析では本多型の役割を明らかにすることはできなかった。④ 血管新生阻害剤であるベバシズマブ併用化学療法を受ける肺癌患者の検討で、CEC の効果予測因子としての意義は見い出せなかった。⑤ ubiquitin E3 ligase の FBX015 が、P-gp の C 末に結合し、ubiquitin E2 enzyme の Ube2r1 と協同して P-gp のポリユビキチン化と分解を担うことを明らかにした。

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
杉本芳一 慶應義塾大学薬学部 教授
西尾和人 近畿大学医学部 教授

施に関する基本方針、研究機関等における動物実験等実施に関する基本方針、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン、等を遵守し、安全性確保の上で実施した。

臨床研究および臨床材料を用いた解析については、疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針、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、個人情報情報の厳守を必須とする。

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、3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、実施施設の倫理委員会の承認を得、遺伝子組み換え動物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律、厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実

C. 研究結果

研究結果は以下のとおりである。

(1) 胃癌・食道癌における FGF/FGFR 遺伝子異常

FGFR2 遺伝子の増幅がみられる細胞株は、FGFR 阻害剤の感受性が極めて高いこと、日本人胃癌手術検体の 4.1% (11 / 267 例) に当該遺伝子の増幅がみられ予後不良であることを報告した。本年は、FGFR2 シグナルに限らず、FGF-FGFR シグナル経路の異常を胃癌ならびに食道癌で検討した。胃癌組織検体を用いた copy number assay による FGFR 遺伝子増幅頻度は、*FGFR1*: 0% (0/152), *FGFR2*: 0% (11/267), *FGFR3*: 0% (0/152), *FGFR4*: 0% (0/152)であった。食道癌では、*FGFR2* 遺伝子増幅を 4% (8/196)に認めた他、*MET*: 1%(2/196), *EGFR*: 7% (16/244), *HER2*: 11% (27/245)であった。リガンドである FGFs では、*FGF3/FGF4* の存在

する 11q13 領域の異常を 40% (77/194) に認めた。Oncoscan による CGH 解析では、*FGFR1* と *FGF3/FGF4* の co-amplification を 46% (13/28) に認めた。

FGF4 遺伝子導入肺癌細胞株 A549/*FGF4*、大腸癌細胞株 WiDr/*FGF4* 細胞は *FGFR* 阻害剤に対し高い *in vivo* 感受性を示した。

(2) 抗体治療の感受性個体差予測

これまで抗体治療の効果には ADCC が重要であり、ADCC の個体差は一定であること、白血球の抗体 (Heat-aggregated IgG; HAG) 刺激時の CXCL-1、3、TNF- α 、TNFSF15 等のサイトカイン mRNA 発現で ADCC 個体差が評価でき臨床効果とも関連することを示した。今回、多施設共同臨床試験の準備として、HAG を採血管内に付着させ採血と同時に刺激を開始、自動的に約 4 時間 37 度で保温できる持ち運び可能なシステムを開発した。

(3) *EGFR* 阻害剤による肺障害関連遺伝子

疾患対象関連解析から *EGFR* 阻害剤による急性肺障害に関わる遺伝子多型として *ABCB1* (P-gp) の rs28364274 を抽出している。本年は、この多型が、P-gp の発現と機能に及ぼす影響を検討した。本 SNP 型 P-gp を NIH3T3 細胞に安定発現させたところ、P-gp 発現量は、野生型 *ABCB1* 導入株と比較して変化はなかった。また、ビンクリスチン輸送、ゲフィチニブによる P-gp 阻害に影響を与えず、機能面からは、この多型の役割を明らかにすることはできなかった。

(4) 血管新生阻害剤における CEC (血中循環内皮細胞)

血管新生阻害作用をもつパクリタキセルとカルボプラチンの併用療法において、治療前 CEC 値は効果予測因子である可能性を報告している。今回カルボプラチン+パクリタキセルと血管新生阻害剤とされる抗 VEGF-A 抗体ベバシズマブ併用療法において、治療前後での CEC 値を測定し、同様の検討を行った。プラチナ製剤+パクリタキセルにおいて確認された投与後の CEC 値の低下は一部の患者に認められたが、腫瘍縮小効果との関連を見出すことができず、17 例の検討で本研究を終了した。

(5) P-gp の分解機構

P-gp の C 末に FLAG タグと HA タグを付加した P-gp-C の免疫沈降により C 末の細胞内ドメインに結合する 22 タンパク質を分離、このうち ubiquitin E3 ligase の FBX015 に着目した。プロテアソーム阻害薬 MG132 は、P-gp ユビキチン化を

亢進、P-gp 発現量を増大、ユビキチン化 P-gp 消失を遅延させた。リソソーム阻害薬は P-gp 発現に影響せず、P-gp 分解にはユビキチン-プロテアソーム系の関与が示された。FBX015 と協調して P-gp ユビキチン化に働く E2 enzyme として、Ube2r1 を同定した。FBX015 の cDNA 導入により、P-gp ユビキチン化は亢進、FBX015 の siRNA 導入によりキャンセルされた。FBX015、Ube2r1 をノックダウンすると P-gp ユビキチン化は抑制され、P-gp 発現は増大した。FBX015 のノックダウンにより、rhodamine123 の細胞内取り込みが低下し、ビンクリスチンに対する感受性が低下した。

以上より、Ube2r1 と FBX015 は、協同してユビキチン-プロテアソーム系による P-gp のユビキチン化と分解に働くと結論された。

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、効果毒性など薬力学的作用のメカニズム、バイオマーカー・感受性規定因子の解析、耐性機構の解明は、個別化治療に向けた重要な知見といえる。

E. 結論

胃癌、食道癌の臨床検体において FGFs、*FGFR1-4* の遺伝子増幅を認め、これらの異常をもつ細胞株は *FGFR* 阻害剤に高い感受性を示すことを示した。抗体治療効果に関わる ADCC 活性の個体差の臨床評価のため、採血と同時に白血球を刺激、一定時間自動保温する持ち運び可能なシステムを開発した。*EGFR* 阻害剤による急性肺障害研に関連する遺伝子多型として抽出した *ABCB1* (P-gp) の rs28364274 の機能解析では本多型の役割を明らかにすることはできなかった。血管新生阻害剤であるベバシズマブ併用化学療法を受ける肺癌患者の検討で、CEC の効果予測因子としての意義は見い出せなかった。⑤ ubiquitin E3 ligase の FBX015 が、P-gp の C 末に結合し、ubiquitin E2 enzyme の Ube2r1 と協同して P-gp のポリユビキチン化と分解を担うことを明らかにした。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Murakami, A., Takahashi, F., Nurwidya, F., Kobayashi, I., Minakata, K., Hashimoto, M., Nara, T., Kato, M., Tajima, K., Shimada, N., Iwakami, S., Moriyama, M., Moriyama, H., Koizumi, F., Takahashi, K. Hypoxia Increases Gefitinib-Resistant Lung Cancer Stem Cells through the Activation of Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor. PLOS ONE, 9(1): e86459, 2014.
- 2) Kimura, H., Ohira, T., Uchida, O., Matsubayashi, J., Shimizu, S., Nagao, T., Ikeda, N., Nishio, K. Analytical performance of the cobas EGFR mutation assay for Japanese non-small-cell lung cancer. Lung Cancer, 83(3): 329-333, 2014.
- 3) Noguchi, K., Katayama, K., Sugimoto, Y. Human ABC transporter ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: Basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics. Pharmacogenomics Pers. Med., 7(1): 53-64, 2014.
- 4) Nakadate, Y., Kodera, Y., Kitamura, Y., Shirasawa, S., Tachibana, T., Tamura, T., Koizumi, F. KRAS Mutation Confers Resistance to Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity of Cetuximab against Human Colorectal Cancer Cells. Int J Cancer, E-pub ahead of print, 2013.
- 5) Hayashi, H., Arao, T., Togashi, Y., Kato, H., Velasco, MA., Kimura, H., Matsumoto, K., Tanaka, K., Okamoto, I., Ito, A., Yamada, Y., Nakagawa, K., Nishio, K. The OCT4 pseudogene POU5F1B is amplified and promotes an aggressive phenotype in gastric cancer. Oncogene, E-pub ahead of print, 2013.
- 6) Hatabe, S., Kimura, H., Arao, T., Kato, H., Hayashi, H., Nagai, T., Matsumoto, K., Velasco, MA., Fujita, Y., Yamanouchi, G., Fukushima, M., Yamada, Y., Ito, A., Okuno, K., Nishio, K. Overexpression of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-2 in colorectal cancer. Mol Clin Oncol., E-pub ahead of print, 2013.
- 7) Katanasaka, Y., Kodera, Y., Kitamura, Y., Morimoto, T., Tamura, T., Koizumi, F. Epidermal growth factor receptor variant type III markedly accelerates angiogenesis and tumor growth via inducing c-myc mediated angiopoietin-like 4 expression in malignant glioma. Mol Cancer, 12: 31, 2013.
- 8) Taniyama, TK., Nokihara, H., Tsuta, K., Horinouchi, H., Kanda, S., Fujiwara, Y., Yamamoto, N., Koizumi, F., Yunokawa, M., Tamura, T. Clinicopathological Features in Young Patients Treated for Small-Cell Lung Cancer: Significance of Immunohistological and Molecular Analyses. Clin Lung Cancer, E-pub ahead of print, 2013.
- 9) Watanabe, M., Uehara, Y., Yamashita, N., Fujimura, Y., Nishio, K., Sawada, T., Takeda, K., Koizumi, F., Koh, Y. Multicolor detection of rare tumor cells in blood using a novel flow cytometry-based system. Cytometry A, 85(3): 206-213, 2013.
- 10) Nakadate, Y., Kodera, Y., Kitamura, Y., Tachibana, T., Tamura, T., Koizumi, F. Silencing of poly(ADP-ribose) glycohydrolase sensitizes lung cancer cells to radiation through the abrogation of DNA damage checkpoint. Biochem Biophys Res Commun., 441(4): 793-798, 2013.
- 11) Kondo, S., Ueno, H., Hosoi, H., Hashimoto, J., Morizane, C., Koizumi, F., Tamura, K., Okusaka, T. Clinical impact of pentraxin family expression on prognosis of pancreatic carcinoma. Br J Cancer, 109(3): 739-746, 2013.
- 12) Kawakami, H., Okamoto, I., Terao, K., Sakai, K., Suzuki, M., Ueda, S., Tanaka, K., Kuwata, K., Morita, Y., Ono, K., Nishio, K., Nishimura, Y., Doi, K., Nakagawa, K. Human papillomavirus DNA and p16 expression in Japanese patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. Cancer Med. 2(6): 933-941, 2013.
- 13) Shiotani, A., Fujita, Y., Fujimura, Y., Sakakibara, T., Nishio, K., Haruma, K. Novel single nucleotide polymorphism markers for low dose aspirin-associated small bowel bleeding. PLOS ONE, 8(12): e84244, 2013.
- 14) Yamada, T., Azuma, K., Muta, E., Kim, J., Sugawara, S., Zhang, GL., Matsueda, S., Kasama-Kawaguchi, Y., Yamashita, Y., Yamashita, T., Nishio, K., Itoh, K., Hoshino, T., Sasada, T. EGFR T790M Mutation as a Possible Target for Immunotherapy; Identification of HLA-A*0201-Restricted T Cell Epitopes

- Derived from the EGFR T790M Mutation. PLOS ONE, 8(11): e78389, 2013.
- 15) Fujita, H., Miyadera, K., Kato, M., Fujioka, Y., Ochiwa, H., Huang, J., Ito, K., Aoyagi, Y., Takenaka, T., Suzuki, T., Ito, S., Hashimoto, A., Suefuji, T., Egami, K., Kazuno, H., Suda, Y., Nishio, K., Yonekura, K. The novel VEGF receptor/MET-targeted kinase inhibitor, TAS-115, has marked in vivo anti-tumor properties and a favorable tolerability profile. *Mol Cancer Ther.*, 12(12): 2685-2696, 2013.
 - 16) Hara, K., Beppu, T., Kimura, M., Fujita, Y., Takata, T., Nishio, K., Ono, N. Influence of novel supramolecular substance, [2] rotaxane, on the caspase signaling pathway in melanoma and colon cancer cells in vitro. *J Pharmacol Sci.*, 122(2): 153-157, 2013.
 - 17) Sakai, K., Horiike, A., Darryl, I., Keita, K., Fujita, Y., Tanimoto, A., Sakatani, T., Saito, R., Kaburaki, K., Noriko, Y., Ohyanagi, F., Nishio, M., Nishio, K. Detection of EGFR T790M mutation in plasma DNA from patients refractory to EGFR tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Sci.*, 104(9): 1198-1204, 2013.
 - 18) Kurahashi, I., Fujita, Y., Arao, T., Kurata, T., Koh, Y., Sakai, K., Matsumoto, K., Tanioka, M., Takeda, K., Takiguchi, Y., Yamamoto, N., Tsuya, A., Matsubara, N., Mukai, H., Minami, H., Chayahara, N., Yamanaka, Y., Miwa, K., Takahashi, S., Takahashi, S., Nakagawa, K., Nishio, K. A microarray-based gene expression analysis to identify diagnostic biomarkers for unknown primary cancer. PLOS ONE, 8(5): e63249, 2013.
 - 19) Tamura, D., Arao, T., Nagai, T., Kaneda, H., Aomatsu, K., Fujita, Y., Matsumoto, K., De Velasco, MA., Kato, H., Hayashi, H., Yoshida, S., Kimura, H., Maniwa, Y., Nishio, W., Sakai, Y., Ohbayashi, C., Kotani, Y., Nishimura, Y., Nishio, K. Slug increases sensitivity to tubulin-binding agents via the downregulation of β III and β IVa-tubulin in lung cancer cells. *Cancer Med.*, 2(2): 144-154, 2013.
 - 20) Higuchi, T., Nakayama, T., Arao, T., Nishio, K., Yoshie, O. SOX4 is a direct target gene of FRA-2 and induces expression of HDAC8 in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 121(18): 3640-3649, 2013.
 - 21) Kato, H., Arao, T., Matsumoto, K., Fujita, Y., Kimura, H., Hayashi, H., Nishiki, K., Iwama, M., Shiraishi, O., Yasuda, A., Shinkai, M., Imano, M., Imamoto, H., Yasuda, T., Okuno, K., Shiozaki, H., Nishio, K. Gene amplification of EGFR, HER2, FGFR2 and MET in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.*, 42(4): 1151-1158, 2013.
 - 22) Yoshida, S., Matsumoto, K., Arao, T., Taniguchi, H., Goto, I., Hanafusa, T., Nishio, K., Yamada, Y. Gene amplification of ribosomal protein s6 kinase-1 and -2 in gastric cancer. *Anticancer Res.*, 33(2): 469-475, 2013.
 - 23) Kawakami, H., Okamoto, I., Arao, T., Okamoto, W., Matsumoto, K., Taniguchi, H., Kuwata, K., Yamaguchi, H., Nishio, K., Nakagawa, K., Yamada, Y. MET amplification as a potential therapeutic target in gastric cancer. *Oncotarget*, 4(1): 9-17, 2013.
 - 24) Hayashi, H., Kurata, T., Fujisaka, Y., Kawakami, H., Tanaka, K., Okabe, T., Takeda, M., Satoh, T., Yoshida, K., Tsunoda, T., Arao, T., Nishio, K., Nakagawa, K. Phase I trial of OTS11101, an anti-angiogenic vaccine targeting vascular endothelial growth factor receptor 1 in solid tumor. *Cancer Sci.*, 104(1): 98-104, 2013.
 - 25) Katayama, K., Noguchi, K., Sugimoto, Y. FBXO15 regulates P-glycoprotein/ABCB1 expression through the ubiquitin - proteasome pathway in cancer cells. *Cancer Sci.*, 104(6): 694-702, 2013.
 - 26) Fujita, Y., Noguchi, K., Suzuki, T., Katayama, K., Sugimoto, Y. Biochemical Interaction of Anti-HCV Telaprevir with the ABC Transporters P-glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein. *BMC Res Notes*, 6: 445, 2013.
 - 27) Katayama, K., Yamaguchi, M., Noguchi, K., Sugimoto, Y. Protein phosphatase complex PP5/PPP2R3C dephosphorylates P-glycoprotein/ABCB1 and down-regulates the expression and function. *Cancer Lett.*, 345(1): 124-131, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

①FGF遺伝子増幅腫瘍の医薬組成物、(特願2013-208361)、発明者：西尾和人他、2013年

②大腸癌マーカー、および予後の予測方法(特開2013-205362)、発明者：西尾和人他、2013年

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

分子標的薬剤の原理の証明と生物学的マーカーに関する臨床研究

研究分担者 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

EGFR阻害剤による急性肺障害研究において、関連遺伝子多型として抽出した*ABCB1* (P-gp) のrs28364274の機能解析を実施した。この多型により、P-gpの発現と安定性、ピンクリスチン輸送能、ゲフィチニブによる機能阻害の程度に変化は認められず、本多型の役割を明らかにすることはできなかった。

血管新生阻害剤治療におけるCEC研究では、これまでの研究成果に基づき、CECの治療前値あるいは治療早期の変動が効果予測因子になりうるかを検証するため、抗VEGF抗体ベバシズマブ併用化学療法を受ける肺癌患者を対象に検討を行った。治療後のCEC値低下は一部の患者に認められたものの、腫瘍縮小効果との関連を見出すことができず、17例の検討で研究を終了した。

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の最適化をめざし、基礎研究、臨床研究を通じて、分子標的治療薬の感受性、耐性、毒性に関わる因子を解明し、効果・毒性の予測バイオマーカーを確立し、治療成績の飛躍的向上を狙う。

本分担研究では、①上皮成長因子受容体 (EGFR) チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) による急性肺障害、②血管新生阻害剤治療における血中循環内皮細胞 (CEC) に関して検討を行った。

B. 研究方法

① EGFR阻害剤による急性肺障害に関する研究

EGFR TKI治療により1か月以内に急性肺障害を発症した患者群と発症しなかった患者群の疾患対象関連解析を行い、急性肺障害に関わる遺伝子多型の探索を目的に候補遺伝子解析 (768SNP) および網羅解析を実施した。抽出された遺伝子多型*ABCB1* (P-gp) のrs28364274について機能解析を実施した。

②血管新生阻害剤治療におけるCECの研究

初回治療としてプラチナ併用療法を受ける患者を対象に、第1サイクル開始前、第8日、第22日にそれぞれ7.5nLの採血を行い、CEC値を測定した (Cell Search変法)。治療前CEC値および治療後の変動と腫瘍縮小効果、無増悪生存期間 (PFS) との関係解析した。今回は、カルボプラチン+パクリタキセル+抗VEGF (血管内皮成長因子) 抗体ベバシズマブ療法を受けた患者群を対象に測定、解析を行った。

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言、臨床研究に関する倫理指針、疫学

研究に関する倫理指針、ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針従い、研究実施計画書の倫理委員会承認、被験者からの説明文書を用いた文書同意 (一部、施設の包括同意を含む)、個人情報への厳守、検体および臨床情報の匿名化を必須とする。

C. 研究結果

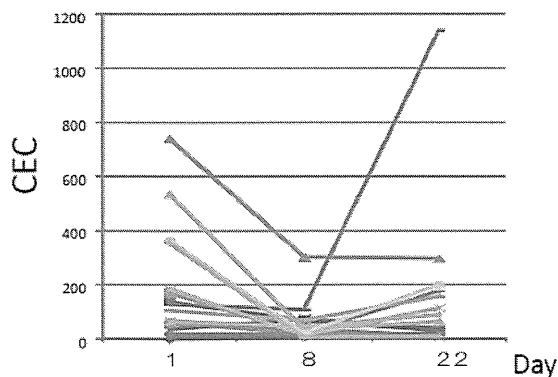
①EGFR阻害剤による急性肺障害に関する研究

これまでに疾患対象関連解析から、EGFR阻害剤による急性肺障害に関わる遺伝子多型として*ABCB1* (P-gp) のrs28364274を抽出している。本年度は、この多型が、P-gpの発現と機能に及ぼす影響を検討した。本SNP型P-gpをNIH3T3細胞に安定発現させたところ、P-gp発現量は、野生型*ABCB1*導入株と比較して変化がなかった。また、ピンクリスチン輸送、ゲフィチニブによるP-gp阻害に影響を与えず、機能面からは、この多型の役割を明らかにすることはできなかった。

②血管新生阻害剤治療におけるCECの研究

これまでに、血管新生阻害作用をもつパクリタキセルとカルボプラチンの併用療法において、治療前CEC値および治療後早期の変動が効果予測因子である可能性を報告している。今回カルボプラチン+パクリタキセルと血管新生阻害剤とされる抗VEGF-A抗体ベバシズマブ併用療法において、治療前後でのCEC値を測定し、同様の検討を行った。プラチナ製剤+パクリタキセルにおいて確認された、投与後のCEC値の低下は一部の患者に認められたが、腫瘍縮小効果との関連を見出すことができず、17例の検討で本研究を終了した。

CBDCA + PTX + bevacizumab療法17例



D. 考察

EGFR阻害剤による急性肺障害に関する研究は、EGFR-TKIによる最も重篤な副作用が急性肺障害であり、①発症に大きな人種差がある、②臨床経過、画像所見、治療反応性が比較的単一であることから、単遺伝子または少数の遺伝子多型(変異)に起因するとの仮説を立て、計画した。今回、抽出された*ABCBI* (P-gp) のrs28364274の機能解析を実施したが、残念ながら、その機能を明らかにすることはできなかった。EGFR-TKIによる急性肺障害の原因解明は極めて重要な課題であり、これにより多くの患者がリスクを避けうることを期待される。今回使用した、急性肺障害患者のDNAは保管されており、新たな知見が得られ次第、原因究明に向けたさらなる解析を実施する予定である。

血管新生阻害剤治療におけるCECの研究では、CECの治療前値あるいは治療早期の変動が血管新生阻害剤による効果の予測因子になりうるかを検証するために計画した。当初の検討では、血管新生阻害作用をもつパクリタキセル併用療法でCEC変動と腫瘍縮小効果が相関し、CEC前値の高い患者でPFSが良好であった。一方血管新生阻害作用を持たないゲムシタビン併用療法ではCEC変動がほとんどなく、CEC前値が低い患者でPFSが良好との結果を得た。今回、抗VEGF抗体であるベバシズマブ療法で確認を行ったが同様の結果は得られなかった。血管新生阻害剤の感受性規定因子が判明すれば、効果の増強、リスクの回避、および治療の効率化が可能となり、その意義は大きい。我々は、VEGF/VEGFRとは異なる血管新生シグナルであるSDF1があるmulti-targeted TKIの効果の予測因子となる可能性を報告している。今後、血管新生阻害剤の効果予測因子に関してさらなる検討を進める予定である。

E. 結論

EGFR阻害剤による急性肺障害に関する研究において、関連遺伝子多型として抽出した*ABCBI* (P-gp) のrs28364274の機能解析を実施した。この多型により、P-gp

の発現と安定性、ピンクリスチン輸送能、ゲフィチニブによる機能阻害の程度に変化は認められず、本多型の役割を明らかにすることはできなかった。

管新生阻害剤治療におけるCECの研究では、これまでの研究成果に基づき、CECの治療前値あるいは治療早期の変動が血管新生阻害剤の効果予測因子になりうるかを検証するため、抗VEGF抗体ベバシズマブ併用化学療法を受ける肺癌患者を対象に検討を行った。治療後のCEC値低下は一部の患者に認められたが、腫瘍縮小効果との関連を見出すことができず、17例の検討で研究を終了した。

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

- 1) Katanasaka, Y., Kodera, Y., Kitamura, Y., Morimoto, T., Tamura, T., Koizumi, F., Epidermal growth factor receptor variant type III markedly accelerates angiogenesis and tumor growth via inducing c-myc mediated angiopoietin-like 4 expression in malignant glioma. *Mol. Cancer*, 112: 31, 2013.
- 2) Nakadate, Y., Kodera, Y., Kitamura, Y., Shirasawa, S., Tachibana, T., Tamura, T., Koizumi, F. KRAS Mutation Confers Resistance to Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity of Cetuximab against Human Colorectal Cancer Cells. *Int. J. Cancer*, Oct 18, [Epub ahead of print] 2013.

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

「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
(抗体治療の感受性研究)

分担研究者 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

乳癌をはじめとするHER2蛋白の発現を伴う悪性腫瘍では、HER2を標的としたTrastuzumabなどの抗体療法が広く用いられている。我々は、その抗腫瘍効果が抗体依存性細胞障害(Antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC)が主たる役割を果たしていることを示してきた。しかしながら、個々人における抗体療法の治療効果を予測する、明らかなバイオマーカーは現在までに見つかっていない。Fcγ receptorの一遺伝子多型が最も報告が多いものの、以前その有用性に関しては議論が分かれるところである。

このため、我々は個々人でADCC活性が異なるという仮説の元、健常人におけるADCC活性の個人差が、日間格差や測定系に依存せず再現されることを示した。さらに、日立化成株式会社との共同研究により、末梢血をIgG刺激した際のサイトカイン・ケモカイン変化を測定する系を確立した。この系を用い、Trastuzumabを含む乳癌術前化学療法患者において、特定のサイトカイン変化が治療効果と関連することを見いだした(米国特許出願)。

現在測定系の自動化、定量化を目指し、検体の自動加温冷却装置を開発中である。

A. 研究目的

悪性腫瘍における抗体薬の作用機序には、直接作用、抗体依存性細胞障害(ADCC)、補体依存性細胞障害(CD C)の3つがあると考えられている。抗体療法は乳癌におけるTrastuzumab療法をはじめとして、様々な癌腫において導入されており、近年ではADCC活性を高めた抗体製剤が開発されるなど、ADCCは非常に注目されている。しかしながら、ADCC活性を中心とした抗体療法の治療効果予測因子は現在までに同定されていない。このため、本研究ではADCC活性が個々人の白血球の能力に寄与するとの仮説のもと、ADCC活性の効果予測因子の同定を目的とした。

B. 研究方法

・対象

健常人およびTrastuzumabを含む乳癌術前化学療法を受ける患者

・抗体薬

ハーセプチン(Trastuzumab, 抗HER2抗体, IgG1)

・ターゲット細胞

MCF-7 (HER2陽性乳癌細胞株)

・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、または健常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時間で評価された。

・治療効果

Trastuzumabを含む乳癌術前化学療法の治療効果として、病理学的寛解(pathological CR)の有無をprimary endpointとした。

(倫理面への配慮)

本研究は、健常人および乳癌患者の末梢血を用いるため、匿名化を行った上で実験者は患者の匿名化番号以外の臨床情報は得ることが出来ないこととした。血液検体の取り扱いには細心の注意を払い、実験終了後は直ちに廃棄した。匿名化番号と臨床データとの連結は、施錠されたロッカー内のPCで行われ、個人情報管理者以外の人間は関与できないものとした。

C. 研究結果

【前年度までの成果】

昨年度までに大腸がんにおけるcetuximabのADCC活性が主たる治療効果をもたらすこと、また転移性乳癌においてTrastuzumabのADCC活性の重要性を報告してきた。これらの結果を受け、ADCC活性の効果予測因子の同定を目指し、以下の検討を行っている。

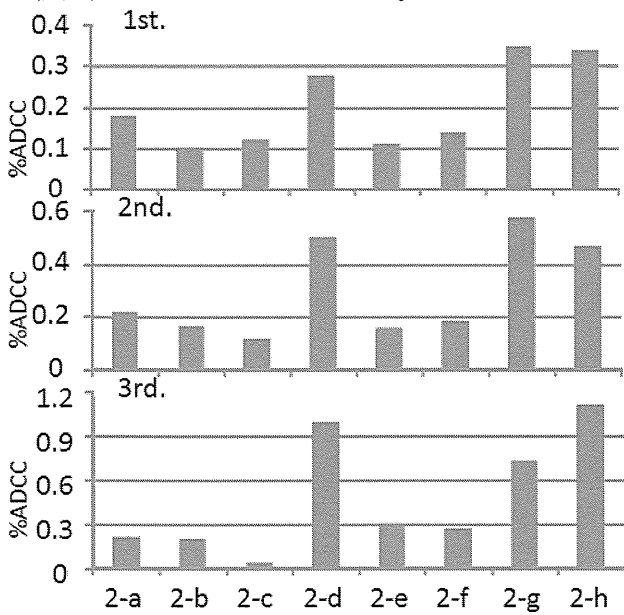
【本年度の成果】

・健常人におけるADCC活性の差

書面で同意を得た健常人より末梢血を採取、末梢血単核球(PBMC)を分離し、ADCC活性を見るためにMCF7をターゲット細胞としたcalcein assayを行った。計8名の健常人から、asasy間で1ヶ月以上期間をあけ、3回検討を行った。またADCC活性に影響を及ぼす因子としてFcγRの一遺伝子多型の測定も行った。

図1に示すように、各時点でADCC活性が高い個体は経時的に見ても強く、また低い個体は常に低いことが

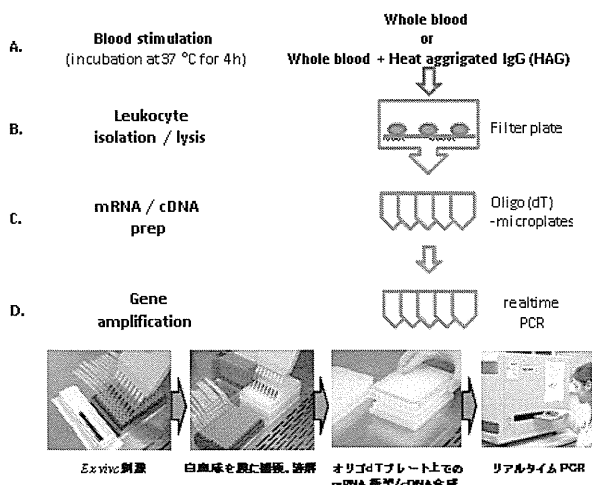
見て取れる。この個体差はFcγRの一遺伝子多型を考慮した上でも明らかな差として認められ、ADCC活性に個人差があることが示された。



(図1) 健常人におけるADCC活性

・ADCC活性の予測因子の同定

ADCC活性の個人差を予測する因子として、ADCCに関与するサイトカイン、ケモカインが存在するとの仮説の元、日立化成株式会社との共同研究により、同社の開発したHemA (+)システムを用いた定量的自動サイトカイン・ケモカインmRNA測定システムを確立した。同システムを用い、健常人のADCC活性とADCCと関連が疑われる14の遺伝子群の変化との相関を検討した。この結果、IL-6, CXCL3, TNFSF15の3遺伝子がADCC活性と相関を示し、ADCC活性の効果予測因子となり得ると考えられた。



(図2) HemA (+) システム

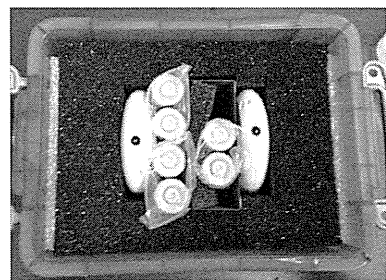
・乳癌術前化学療法での検討

同様に、trastuzumabを含む乳癌術前化学療法を受ける患者より、書面で同意を取得のうえ末梢血を採取、

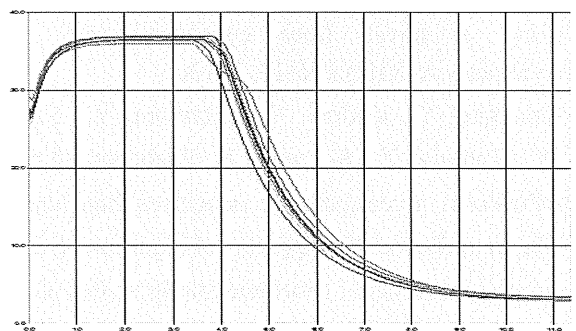
HemA (+)システムと臨床的治療効果(pCR)との相関を検討した。その結果、健常人での検討の結果と同様、4つの遺伝子群が臨床効果と相関を示した。本研究結果は現在論文投稿中である。

・安定した測定系の確立

上記検討を行う中で、末梢血のIgG刺激による測定誤差が生じる可能性、また操作が入ることによる誤差が生じる可能性が判明した。このため、刺激を全自動で行うシステムの開発を行った。本システムでは一度に4例分の採血管を一度に刺激することが可能であり、37度4時間、その後4度へ低下する。本システムを用いることにより多施設での採取、測定が可能であり、今後の臨床応用の可能性がある。



(図3) 自動加温冷却装置



(図4) 温度変化

D. 考察

抗体療法の抗腫瘍活性はADCCが重要であることを、様々な癌腫、様々な抗体製剤を用い、一貫して示してきた。ADCC活性の重要性は非常に注目されてきているものの、その作用機序や耐性機序、効果予測因子など不明な点が多い。我々が開発したシステムを用いることで効果予測が出来る可能性があるほか、検討から浮かび上がったサイトカイン、ケモカインから作用機序、耐性機序の解明に結びつく可能性があると考えられる。

E. 結論

抗体制剤のADCC活性は個人により異なり、時間によらず再現性があることが示された。乳癌の術前化学療法モデルにおいて、治療効果と相関のあるサイトカインを4つ見いだした。これらの結果を基に、ADCCの作用機序、耐性機序の解明などさらなる検討を行って

いく。

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. Murakami, A., Takahashi, F., Nurwidya, F., Kobayashi, I., Minakata, K., Hashimoto, M., Nara, T., Kato, M., Tajima, K., Shimada, N., Iwakami, S., Moriyama, M., Moriyama, H., Koizumi, F., Takahashi, K. Hypoxia Increases Gefitinib-Resistant Lung Cancer Stem Cells through the Activation of Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor. PLoS One. 28;9(1):e86459, 2014.
2. Taniyama, TK., Nokihara, H., Tsuta, K., Horinouchi, H., Kanda, S., Fujiwara, Y., Yamamoto, N., Koizumi, F., Yunokawa, M., Tamura, T. Clinicopathological Features in Young Patients Treated for Small-Cell Lung Cancer: Significance of Immunohistological and Molecular Analyses. Clin Lung Cancer. 14. pii: S1525-7304(13)00257-X, 2013.
3. Watanabe, M., Uehara, Y., Yamashita, N., Fujimura, Y., Nishio, K., Sawada, T., Takeda, K., Koizumi, F., Koh, Y. Multicolor detection of rare tumor cells in blood using a novel flow cytometry-based system. Cytometry A. 85(3):206-13, 2013.
4. Nakadate, Y., Kodera, Y., Kitamura, Y., Tachibana, T., Tamura, T., Koizumi, F. Silencing of poly(A DP-ribose) glycohydrolase sensitizes lung cancer cells to radiation through the abrogation of DNA damage checkpoint. Biochem Biophys Res Commun. 29;441(4):793-8, 2013.
5. Nakadate, Y., Kodera, Y., Kitamura, Y., Shirasawa, S., Tachibana, T., Tamura, T., Koizumi, F. KRA S Mutation Confers Resistance to Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity of Cetuximab against Human Colorectal Cancer Cells. Int J Cancer. Epub ahead of print, 2013.
6. Murakami, H., Yamamoto, N., Koizumi, F., Nishio, K., Yusa, W., Koyama, N., Tamura, T. Phase 1 study of lenvatinib combined with carboplatin and paclitaxel in patients with non-small-cell lung cancer. Br J Cancer. 6;109(3):538-44, 2013.
7. Kondo, S., Ueno, H., Hosoi, H., Hashimoto, J., Morizane, C., Koizumi, F., Tamura, K., Okusaka, T. Clinical impact of pentraxin family expression on prognosis of pancreatic carcinoma. Br J Cancer. 6;109(3):739-46, 2013.

8. Katanasaka, Y., Kodera, Y., Kitamura, Y., Morimoto, T., Tamura, T., Koizumi, F. Epidermal growth factor receptor variant type III markedly accelerates angiogenesis and tumor growth via inducing c-myc mediated angiopoietin-like 4 expression in malignant glioma. Mol Cancer. 25;12:31, 2013.

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
特になし

3. その他
特になし

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

胃癌、食道癌においてFGFs、FGFR1-4の遺伝子増幅を認め、同コピー数異常を有するがん細胞は、FGFR阻害剤に対する感受性が獲得されていることを示した。FGFR阻害剤のコンパニオン診断薬の臨床試験の可能性を示唆した。

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の最適化をめざし、基礎研究、臨床研究を通じて、分子標的治療薬の感受性、耐性、毒性に関わる因子を解明し、効果・毒性の予測バイオマーカーを確立し、治療成績の飛躍的向上を狙う。

本分担研究では、胃がんにおけるFGFR阻害剤の効果予測バイオマーカーの実用化研究。前向きに胃がんの臨床検体を収集し、FGFR遺伝子増幅の診断のための適切なアッセイ系を検討、構築する。

B. 研究方法

胃癌組織検体152例の手術切除、内視鏡下生検組織を用いたcopy number assayによるFGFR遺伝子増幅頻度は、*FGFR1*: 0% (0/152), *FGFR2*: 0% (11/267), *FGFR3*: 0% (0/152), *FGFR4*: 0% (0/152)であった。また、食道癌においては、*FGFR2*遺伝子増幅を4% (8/196)に認めた。他の標的分子のコピー数異常(増幅)の頻度は、*MET*: 1%(2/196), *EGFR*: 7% (16/244), *HER2*: 11% (27/245)であった。FGF-FGFRシグナル経路のうち、リガンドであるFGFsのcopy number assayによる分子異常の検討から、*FGF3*/*FGF4*の存在する11q13領域の異常が40% (77/194)でみとめられた。OncoscanによるFFPEサンプルのCGH解析からは、*FGFR1*と*FGF3*/*FGF4*のco-amplificationが46% (13/28)に認められた。これらの結果は食道癌において、極めて高頻度にFGF-FGFRシグナル伝達機構の異常が生じていることを示唆している。さらに食道癌におけるFGFR融合遺伝子によるFGFRシグナル伝達機構の異常の可能性も考えられ、現在NGSを用いた検討を行っている。

これらの結果を基に、胃癌ならびに食道癌細胞株に対するFGFR阻害剤の効果の基礎的検討を実施した。FGFR2遺伝子増幅胃癌細胞株HSC-43, HSC-39, KATOIIIは、FGFR阻害剤に対し高いin vitro感受性を示した。*FGF4*遺伝子導入肺癌細胞株A549/*FGF4*、大腸癌細胞株WiDr/*FGF4*細胞を作製し、担癌マウスモデルにおいてFGFR阻害剤に対する感受性を検討した結果、これらの*FGF4*遺伝子導入細胞株はFGFR阻害剤に対し高いin vivo感受性を示

した。

(倫理面への配慮)

基礎研究においては、実施施設の倫理委員会の承認を得、遺伝子組み換え動物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律、厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本方針、研究機関等における動物実験等実施に関する基本方針、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン、等を遵守し、安全性確保の上で実施した。

臨床材料を用いた解析については、疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、(1)研究実施計画書の施設倫理委員会承認、(2)被験者本人からの説明文書を用いた文書同意、(3)個人情報保護の厳守、(3)安全性評価委員会などの第三者的監視、を必須とし実施した。

C. 研究結果

前年度までに、*FGFR2*遺伝子の増幅がみられる細胞株は、FGFR阻害剤の感受性が極めて高い事、手術検体の検討から、日本人胃癌の4.1% (11 / 267例)に当該遺伝子の増幅がみられ予後不良であること、これらの症例においては、FGFR阻害剤が著効する可能性が高いことを報告した。本年度は、さらにFGFR2シグナルに限らず、FGF-FGFRシグナル経路の異常を胃癌ならびに食道癌で検討した。胃癌組織検体を用いたcopy number assayによるFGFR遺伝子増幅頻度は、*FGFR1*: 0% (0/152), *FGFR2*: 0% (11/267), *FGFR3*: 0% (0/152), *FGFR4*: 0% (0/152)であった。また、食道癌においては、*FGFR2*遺伝子増幅を4% (8/196)に認めた。他の標的分子のコピー数異常(増幅)の頻度は、*MET*: 1%(2/196), *EGFR*: 7% (16/244), *HER2*: 11% (27/245)であった。FGF-FGFRシグナル経路のうち、リガンドであるFGFsのcopy number assayによる分子異常の検討から、*FGF3*/*FGF4*の存在する11q13領域の異常が40% (77/194)でみとめられた。OncoscanによるFFPEサンプルのCGH解析からは、*FGFR1*と*FGF3*/*FGF4*のco-ampli

ficationが46% (13/28)に認められた。これらの結果は食道癌において、極めて高頻度にFGF-FGFRシグナル伝達機構の異常が生じていることを示唆している。さらに食道癌における*FGFR*融合遺伝子によるFGFRシグナル伝達機構の異常の可能性も考えられ、現在NGSを用いた検討を行っている。

これらの結果を基に、胃癌ならびに食道癌細胞株に対するFGFR阻害剤の効果の基礎的検討を実施した。FGFR2遺伝子増幅胃癌細胞株HSC-43, HSC-39, KATOIIIは、FGFR阻害剤に対し高い*in vitro*感受性を示した。*FGF4*遺伝子導入肺癌細胞株A549/*FGF4*、大腸癌細胞株WiDr/*FGF4*細胞を作製し、担癌マウスモデルにおいてFGFR阻害剤に対する感受性を検討した結果、これらの*FGF4*遺伝子導入細胞株はFGFR阻害剤に対し高い*in vivo*感受性を示した。

D. 考察

各がん種におけるFGF-FGFRシグナル伝達経路の異常はこれまでに報告されているが、日本人の食道癌におけるFGF-FGFRシグナルの分子異常の報告はあまりなく、特に食道癌において*FGF4*増幅が高頻度認められること、また、それらには、FGFR阻害剤の高い抗腫瘍効果が期待されることは新しい知見であり、特許申請を行った(特願2013-208361)。また、FGFR2増幅胃癌、*FGF4*増幅癌などのFGF-FGFR alteration 陽性腫瘍食道癌に対するFGFR阻害剤の効果が期待される基礎的知見を得たことにより、既知の*FGFR1*遺伝子増幅肺癌、FGFR遺伝子変異陽性膀胱癌などとあわせて、FGF-FGFRシグナル異常癌を対象としたFGFR阻害剤のコンパニオン診断薬が必要であることを提示することができた。NGSを用いたプレスクリーニングを利用し、エンリッチメントデザインでのFGFR阻害剤の臨床試験を準備している。

E. 結論

胃癌・食道癌におけるFGFR阻害剤の効果予測バイオマーカーの実用化研究として、*FGF3/4*のコピー数変動解析およびFISHを提示し、それらが、FGFR阻害剤の著効を予測するコンパニオン診断への応用が可能であることを示した。

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. Kimura, H., Ohira, T., Uchida, O., Matsubayashi, J., Shimizu, S., Nagao, T., Ikeda, N., Nishio, K. Analytical performance

of the cobas EGFR mutation assay for Japanese non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, 83(3):329-333, 2014.

2. Kawakami, H., Okamoto, I., Terao, K., Sakai, K., Suzuki, M., Ueda, S., Tanaka, K., Kuwata, K., Morita, Y., Ono, K., Nishio, K., Nishimura, Y., Doi, K., Nakagawa, K. Human papillomavirus DNA and p16 expression in Japanese patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* 2(6): 933-41, 2013.
3. Shiotani, A., Fujita, Y., Fujimura, Y., Sakakibara, T., Nishio, K., Haruma, K. Novel single nucleotide polymorphism markers for low dose aspirin-associated small bowel bleeding. *PLOS ONE*, 8(12): e84244, 2013.
4. Hayashi, H., Arai, T., Togashi, Y., Kato, H., Velasco, M.A., Kimura, H., Matsumoto, K., Tanaka, K., Okamoto, I., Ito, A., Yamada, Y., Nakagawa, K., Nishio, K. The OCT4 pseudogene POU5F1B is amplified and promotes an aggressive phenotype in gastric cancer. *Oncogene*, E-pub ahead of print.
5. Yamada, T., Azuma, K., Muta, E., Kim, J., Sugawara, S., Zhang, G.L., Matsueda, S., Kasama-Kawaguchi, Y., Yamashita, Y., Yamashita, T., Nishio, K., Itoh, K., Hoshino, T., Sasada, T. EGFR T790M Mutation as a Possible Target for Immunotherapy; Identification of HLA-A*0201-Restricted T Cell Epitopes Derived from the EGFR T790M Mutation. *PLOS ONE*, 8(11): e78389, 2013.
6. Fujita, H., Miyadera, K., Kato, M., Fujioka, Y., Ochiwa, H., Huang, J., Ito, K., Aoyagi, Y., Takenaka, T., Suzuki, T., Ito, S., Hashimoto, A., Suefuji, T., Egami, K., Kazuno, H., Suda, Y., Nishio, K., Yonekura, K. The novel VEGF receptor/MET-targeted kinase inhibitor, TAS-115, has marked *in vivo* anti-tumor properties and a favorable tolerability profile. *Mol Cancer Ther.*, 12(12): 2685-96, 2013.
7. Okamoto, W., Yoshino, T., Takahashi, T., Okamoto, I., Ueda, S., Tsuya, A., Boku, N., Nishio, K., Fukuoka, M., Yamamoto, N., Nakagawa, K. A phase I, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of nimotuzumab in

- Japanese patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 72(5): 1063-71, 2013.
8. Hatabe, S., Kimura, H., Arao, T., Kato, H., Hayashi, H., Nagai, T., Matsumoto, K., Velasco, MA., Fujita, Y., Yamanouchi, G., Fukushima, M., Yamada, Y., Ito, A., Okuno, K., Nishio, K. Overexpression of heparan sulfate 6 O sulfotransferase 2 in colorectal cancer. *Mol Clin Oncol.*, E-pub ahead of print, 2013.
 9. Nishio, M., Horai, T., Horiike, A., Nokihara, H., Yamamoto, N., Takahashi, T., Murakami, H., Yamamoto, N., Koizumi, F., Nishio, K., Yusa, W., Koyama, N., Tamura, T. Phase I study of lenvatinib combined with carboplatin and paclitaxel in patients with non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*, 109(3): 538-44, 2013.
 10. Hara, K., Beppu, T., Kimura, M., Fujita, Y., Takata, T., Nishio, K., Ono, N. Influence of novel supramolecular substance, [2] rotaxane, on the caspase signaling pathway in melanoma and colon cancer cells in vitro. *J Pharmacol Sci.*, 122(2): 153-7, 2013.
 11. Sakai, K., Horiike, A., Darryl, I., Keita, K., Fujita, Y., Tanimoto, A., Sakatani, T., Saito, R., Kaburaki, K., Noriko, Y., Ohyanagi, F., Nishio, M., Nishio, K. Detection of EGFR T790M mutation in plasma DNA from patients refractory to EGFR tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Sci.*, 104(9): 1198-204, 2013.
 12. Katakami, N., Atagi, S., Goto, K., Hida, T., Horai, T., Inoue, A., Ichinose, Y., Kobayashi, K., Takeda, K., Kiura, K., Nishio, K., Seki, Y., Ebisawa, R., Shahidi M., Yamamoto, N. LUZ-Lung 4: A phase II trial of afatinib in patients with advanced, non-small cell lung cancer who progressed on prior treatment with erlotinib, gefitinib, or both. *J Clin Oncol.*, 31(27): 3335-41, 2013.
 13. Kurahashi, I., Fujita, Y., Arao, T., Kurata, T., Koh, Y., Sakai, K., Matsumoto, K., Tanioka, M., Takeda, K., Takiguchi, Y., Yamamoto, N., Tsuya, A., Matsubara, N., Mukai, H., Minami, H., Chayahara, N., Yamanaka, Y., Miwa, K., Takahashi, S., Takahashi, S., Nakagawa, K., Nishio, K. A microarray-based gene expression analysis to identify diagnostic biomarkers for unknown primary cancer. *PLOS ONE*, 8(5): e63249, 2013.
 14. Tamura, D., Arao, T., Nagai, T., Kaneda, H., Aomatsu, K., Fujita, Y., Matsumoto, K., De Velasco, MA., Kato, H., Hayashi, H., Yoshida, S., Kimura, H., Maniwa, Y., Nishio, W., Sakai, Y., Ohbayashi, C., Kotani, Y., Nishimura, Y., Nishio, K. Slug increases sensitivity to tubulin-binding agents via the downregulation of β III and β IV α -tubulin in lung cancer cells. *Cancer Med.*, 2(2): 144-54, 2013.
 15. Higuchi, T., Nakayama, T., Arao, T., Nishio, K., Yoshie, O. SOX4 is a direct target gene of FRA-2 and induces expression of HDAC8 in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 121(18): 3640-9, 2013.
 16. Kato, H., Arao, T., Matsumoto, K., Fujita, Y., Kimura, H., Hayashi, H., Nishiki, K., Iwama, M., Shiraishi, O., Yasuda, A., Shinkai, M., Imano, M., Imamoto, H., Yasuda, T., Okuno, K., Shiozaki, H., Nishio, K. Gene amplification of EGFR, HER2, FGFR2 and MET in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.*, 42(4): 1151-8, 2013.
 17. Yoshida, S., Matsumoto, K., Arao, T., Taniguchi, H., Goto, I., Hanafusa, T., Nishio, K., Yamada, Y. Gene amplification of ribosomal protein s6 kinase-1 and -2 in gastric cancer. *Anticancer Res.*, 33(2): 469-75, 2013.
 18. Kawakami, H., Okamoto, I., Arao, T., Okamoto, W., Matsumoto, K., Taniguchi, H., Kuwata, K., Yamaguchi, H., Nishio, K., Nakagawa, K., Yamada, Y. MET amplification as a potential therapeutic target in gastric cancer. *Oncotarget*, 4(1): 9-17, 2013.
 19. Hayashi, H., Kurata, T., Fujisaka, Y., Kawakami, H., Tanaka, K., Okabe, T., Takeda, M., Satoh, T., Yoshida, K., Tsunoda, T., Arao, T., Nishio, K., Nakagawa, K. Phase I trial of OTS11101, an anti-angiogenic vaccine targeting vascular endothelial

growth factor receptor 1 in solid tumor.
Cancer Sci., 104(1): 98-104, 2013.

H. 知的財産等の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

1. FGF遺伝子増幅腫瘍の医薬組成物、（特願2013-208361）、発明者：西尾和人他、2013年
2. 大腸癌マーカー、および予後の予測方法（特開2013-205362）、発明者：西尾和人他、2013年

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

ubiquitin E3 ligaseのFBX015が、P-糖タンパク質（P-gp）のC末の細胞内ドメインに結合することを見出した。このFBX015とubiquitin E2 enzymeのUbe2r1が、協同してP-gpのポリユビキチン化に働き、P-gpの分解を誘導して発現を低下させることを示した。以上より、FBX015とUbe2r1が、P-gpのユビキチン-プロテアソーム系による分解の担い手であることを明らかにした。

A. 研究目的

P-糖タンパク質（P-gp）は、がん化学療法において、がん細胞の抗がん剤耐性および抗がん剤の体内動態の制御に関与する重要な因子である。我々はこれまでに、MEK阻害薬がP-gpの分解を促進させ、P-gpの発現を低下させることを明らかにしてきた。本研究では、P-gpの翻訳後修飾にかかわる因子を同定し、その機能を解析することを目的とした。

B. 研究方法

P-gpのC末の細胞内ドメイン（997-1280 a. a.）にFLAGタグとHAタグを付加したcDNAを作成した。これを発現ベクターに組み込んでHEK293細胞に導入した。この細胞より、anti-FLAG M2 affinity gelとanti-HA affinity gelを用いてP-gp-Cを精製した。得られた免疫沈降物をSDS-PAGEで分離後、Coomassie Brilliant Blue染色により結合タンパク質を確認した。各バンドを切り出してトリプシン消化後、MALDI-TOF/MS解析を行った。P-gpの発現はwestern blotで、細胞膜上のP-gp発現はFACSで解析した。P-gpのユビキチン化は免疫沈降-western blotにより検討した。また、ヒトの23個のE2 ubiquitin-conjugating enzymeを全てクローニングして細胞に導入し、P-gpとの相互作用について検討した。P-gpの機能は、rhodamine123（R123）の細胞内蓄積とビンクリスチン（VCR）の感受性試験で調べた。

（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。

C. 研究結果

免疫沈降によりP-gpのC末の細胞内ドメインに結合するタンパク質を分離した。SDS-PAGEにより、17本の

タンパク質のバンドを検出した。これをMALDI-TOF/MS解析したところ、22種類の候補タンパク質が同定された。このうち、ubiquitin E3 ligaseのFBX015に着目して実験を進めた。

プロテアソーム阻害薬のMG132は、P-gpのユビキチン化を亢進させ、P-gpの発現量を増大させた。また、ユビキチン化 P-gpの消失を遅延させた。リソソーム阻害薬はP-gpの発現に影響しなかった。これにより、P-gpの分解にユビキチン-プロテアソーム系が関与することが示唆された。

タンパク質のユビキチン化には、E2 ubiquitin-conjugating enzymeとE3 ligaseが必要である。FBX015と協調してP-gpのユビキチン化に働くE2 enzymeを同定するため、ヒトの23個のE2 enzymeの全てのcDNAを作成してそれぞれ細胞に導入し、FBX015およびP-gpとの結合を検討した結果、Ube2r1がこの両者に結合することが明らかになった。

FBX015とUbe2r1の、P-gpのユビキチン化と分解に対する効果を検証するため、cDNA導入実験およびsiRNA導入実験を行った。その結果、FBX015のcDNA導入により、P-gpのユビキチン化は亢進した。このユビキチン化は、FBX015のsiRNAの導入によりキャンセルされた。また、FBX015、Ube2r1をノックダウンすると、P-gpのユビキチン化は抑制され、P-gpの発現は増大した。FBX015のノックダウンにより、細胞へのrhodamine123の取り込みが低下し、vincristine に対する感受性が低下した。

以上より、Ube2r1とFBX015は、協同してユビキチン-プロテアソーム系によるP-gpのユビキチン化と分解に働くと結論された。

D. 考察

がん細胞におけるP-gpの発現は、そのがんの抗がん剤感受性の重要な決定因子である。これまで、P-gpの発現制御機構として、MDR1遺伝子（P-gpの遺伝子）の増幅や転写活性化、メチル化などの研究が多く行われて

きたが、P-gpの分解の制御機構に関する研究はほとんど行われてこなかった。本研究は、P-gpの分解の機構を明らかにするとともに、細胞膜タンパク質のユビキチン-プロテアソーム系による分解機構についても新たな知見を提供するものである。

2. 実用新案登録
なし
3. その他

E. 結論

ubiquitin E3 ligaseのFBX015が、P-糖タンパク質 (P-gp) のC末の細胞内ドメインに結合することを見出した。このFBX015と、ubiquitin E2 enzymeのUbe2r1が、協同してP-gpのポリユビキチン化に働き、P-gpの分解を誘導して発現を低下させることを示した。以上より、FBX015とUbe2r1が、P-gpのユビキチン-プロテアソーム系による分解の担い手であることを明らかにした。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

1. Katayama, K., Noguchi, K., Sugimoto, Y. FBX015 regulates P-glycoprotein/ABCB1 expression through the ubiquitin-proteasome pathway in cancer cells. *Cancer Sci.*, 104(6):694-702, 2013.
2. Fujita, Y., Noguchi, K., Suzuki, T., Katayama, K., Sugimoto, Y. Biochemical Interaction of Anti-HCV Telaprevir with the ABC Transporters P-glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein. *BMC Res, Notes*, 6:445, 2013.
3. Katayama, K., Yamaguchi, M., Noguchi, K., Sugimoto, Y. Protein phosphatase complex PP5/PPP2R3C dephosphorylates P-glycoprotein/ABCB1 and down-regulates the expression and function. *Cancer Lett.*, 345(1):124-131 2013.
4. Noguchi, K., Katayama, K., Sugimoto, Y. Human ABC transporter ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: Basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics. *Pharmacogenomics Pers. Med.*, 7(1):53-64, 2014.

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

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	Murakami, A., Takahashi, F., Nurwidya, F., Kobayashi, I., Minakata, K., Hashimoto, M., Nara, T., Kato, M., Tajima, K., Shimada, N., Iwakami, S., Moriyama, M., Moriyama, H., <u>Koizumi, F.</u> , Takahashi, K.	Hypoxia Increases Gefitinib-Resistant Lung Cancer Stem Cells through the Activation of Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor.	PLOS ONE	9(1)	e86459	2014
2	Kimura, H., Ohira, T., Uchida, O., Matsubayashi, J., Shimizu, S., Nagao, T., Ikeda, N., <u>Nishio, K.</u>	Analytical performance of the cobas EGFR mutation assay for Japanese non-small-cell lung cancer.	Lung Cancer	83(3)	329-333	2014
3	Noguchi, K., Katayama, K., <u>Sugimoto, Y.</u>	Human ABC transporter ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: Basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics.	Pharmacogenomics Pers Med.	7(1)	53-64	2014
4	Nakadate, Y., Koderu, Y., Kitamura, Y., Shirasawa, S., Tachibana, T., <u>Tamura, T.</u> , <u>Koizumi, F.</u>	KRAS Mutation Confers Resistance to Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity of Cetuximab against Human Colorectal Cancer Cells.	Int J Cancer		in press	2013
5	Hayashi, H., Arai, T., Togashi, Y., Kato, H., Velasco, MA., Kimura, H., Matsumoto, K., Tanaka, K., Okamoto, I., Ito, A., Yamada, Y., Nakagawa, K., <u>Nishio, K.</u>	The OCT4 pseudogene POU5F1B is amplified and promotes an aggressive phenotype in gastric cancer.	Oncogene		in press	2013