

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。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。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相関することを示した。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、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。

(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、ピンクリスチン 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。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., Arai, 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., Arai, 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 III and 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. FBX015 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

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

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