

40. 【乳癌を究める】 治療 胸筋温存乳房切除術,  
九富 五郎, 大村 東生, 里見 蒔乃, 高丸 智子, 島  
宏彰, 鈴木 やすよ, 平田 公一  
外科(0016-593X)74 巻7号 Page721-724(2012.07)

## 2. 学会発表

1. 乳癌予後規定因子としての hER01-L $\alpha$  の可能性.  
九富 五郎, 田村 保明, 久木田和晴, 里見 蒔  
乃, 島 宏彰, 亀嶋 秀和, 大村 東生, 鳥越  
俊彦, 佐藤 昇志, 平田 公一. 第 113 回日本外  
科学会定期学術集会:福岡(2013年4月11-13日)
2. SPECT/CTによるセンチネルリンパ節の局在の検  
討. 島 宏彰, 鈴木 やすよ, 里見 蒔乃, 高丸 智  
子, 九富 五郎, 畠中 正光, 平田公一. 第 113 回  
日本外科学会定期学術集会:福岡(2013年4月  
11-13日)
3. 他疾患治療中に発見された乳癌の検討. 島 宏彰,  
鈴木 やすよ, 里見 蒔乃, 高丸 智子, 亀嶋 秀和,  
大村 東生, 湯山友一, 九富 五郎, 長谷川 匡, 平  
田 公一. 第 30 回日本乳癌甲状腺超音波診断会  
議:福島(2013年4月20-21日)
4. 造影 CTによる術前腋窩リンパ節評価におけるス  
コア化の可能性. 九富 五郎, 鈴木 やすよ, 里  
見 蒔乃, 高丸 智子, 島 宏彰, 亀嶋 秀和, 大  
村東生, 平田 公一. 第 21 回日本乳癌学会学術総  
会:浜松(2013年6月27-29日)
5. マンモグラフィで所見を認めなかった乳癌症例  
の検討. 鈴木 やすよ, 岡崎 稔, 岡崎 亮, 渡部  
芳樹, 浅石 和昭, 増岡 秀次, 岡崎 裕, 里見  
蒔乃, 島 宏彰, 九富 五郎, 大村 東生, 長谷  
川 匡,  
平田 公一. 第 21 回日本乳癌学会学術総会:浜  
松(2013年6月27-29日)
6. 当院ならびに大学乳腺チーム医師が関与してい  
る施設乳癌検診の成績 亀嶋 秀和, 大村 東生,  
九富 五郎, 島 宏彰, 鈴木 やすよ, 里見 蒔  
乃, 平田 公一 第 21 回日本乳癌学会学術総会:  
浜松(2013年6月27-29日)
7. SPECT/CTによるセンチネルリンパ節の局在の検  
討 島 宏彰, 鈴木 やすよ, 里見 蒔乃, 高丸 智子,  
九富 五郎, 畠中 正光, 平田公一. 第 21 回日本  
乳癌学会学術総会:浜松(2013年6月27-29日)
8. 当科の妊娠期乳癌 4 例の治療経験 里見 蒔乃,  
鈴木 やすよ, 高丸 智子, 島 宏彰, 九富 五  
郎, 亀嶋 秀和, 大村 東生, 平田 公一. 第 21  
回日本乳癌学会学術総会:浜松(2013年6月  
27-29日)
9. 家族歴の有無で検診への意識は異なるか? 島  
宏彰, 九富 五郎, 里見 蒔乃, 高丸 智子, 前田 豪  
樹, 亀嶋 秀和, 大村 東生, 古畑 智久, 平田 公  
一. 第 19 回日本家族性腫瘍学会学術集会:別府  
(2013年7月26日)
10. 遊離真皮脂肪弁移植を施行した 4 例 九富 五  
郎, 島 宏彰, 前田 豪樹, 里見 蒔乃, 亀嶋 秀  
和, 大村 東生, 平田 公一. 第 1 回日本乳房オ  
ンコプラスチックサージャリー学会総会:福岡  
(2013年9月19-20日)
11. 当院で経験した乳房造形超音波検査. 島 宏彰,  
九富 五郎, 里見 蒔乃, 前田 豪樹, 亀嶋 秀和,  
大村 東生, 湯山 友一, 平田 公一. 第 31 回日  
本乳癌甲状腺超音波診断会議:神戸(2013年9  
月22-23日)
12. ゲノムワイド関連解析による乳がん予後規定遺  
伝子の同定 九富 五郎, 平田 公一, 清谷 一  
馬, 蓮田 泰誠, 角田 達彦, 安芸 史典, 高塚  
雄一, 岡崎 稔, 大住 省三, 山川 卓, 笹 三  
徳, 中村祐輔, 前佛 均. 第 72 回日本癌学会学  
術総会:横浜(2013年10月3-5日)
13. 転移・再発乳癌症例に対する nab-paclitaxel と  
Cyclophosphamide の併用第 I 相試験  
(ABC-BC01). 里見 蒔乃, 九富 五郎, 島 宏彰, 前  
田 豪樹, 岡崎 稔, 岡崎 亮, 渡部 芳樹, 佐藤  
文彦, 増岡 秀次, 三神 俊彦, 大村 東生, 亀嶋  
秀和, 澁谷 均, 佐々木 賢一, 平田 公一. 第 51  
回日本癌治療学会学術集会:京都(2013年10月  
24-26日)
14. 当科にて経験した男性乳癌 6 症例. 里見 蒔乃,  
九富 五郎, 前田 豪樹, 島 宏彰, 鈴木 やすよ,  
亀嶋 秀和, 大村東生, 平田 公一. 第 75 回日本  
臨床外科学会総会:名古屋(2013年11月21-23  
日)
15. HSP-癌ペプチド複合体ワクチンの治療への可  
能性. 九富 五郎, 田村 保明, 廣橋 良彦,  
鳥越 俊彦, 島 宏彰, 前田 豪樹, 里見 蒔

乃、水口 徹、古畑 智久、佐藤 昇志、平田 公一、第26回日本バイオセラピー学会学術総会：盛岡(2013年12月5-6日)

16:ゲノムワイド関連解析によるジェムザール副作用関連遺伝子の同定、前佛 均、清谷 一馬、宇野 智子、筈田 泰誠、光畑 直喜、木村 康利、山上 裕機、平田 公一、中村 祐輔、日本人類遺伝学会 第57回大会、東京(2012.10)

17:ゲノムワイド関連解析による膀胱発症関連遺伝子およびジェムシタビン副作用関連遺伝子の同定、前佛 均、口羽 文、Siew-Kee Low、清谷 一馬、宇野 智子、筈田 泰誠、久保 充明、平田 公一、木村 康利、山上 裕機、吉田 輝彦、坂本 裕美、中村 祐輔、第71回日本癌学会学術総会、札幌市(2012.09)

18:遺伝子発現プロファイルに基づく乳がん術前化学療法感受性予測システムの構築、鈴木 やすよ、前佛 均、西舘 敏彦、植木 知身、九富 五郎、高丸 智子、平田 公一、第71回日本癌学会学術総会、札幌市 (2012.09)

19: 遺伝子診断による乳癌オーダーメイド医療、前佛 均、平田 公一、安井 寛、神津 英至、和田 卓郎、第3回日本プライマリ・ケア連合学会学術大会、福岡市 (2012.9.2)

H. 知的財産権の出願・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

癌幹細胞を制御する転写因子を標的とした難治性乳癌治療法の開発

研究分担者 前佛 均 国立がん研究センター研究所 遺伝医学研究分野 ユニット長

研究要旨

乳がん幹細胞に対する新規分子標的治療薬開発の候補として有望な PRDM14 遺伝子について、マイクロアレイ解析、qRT-PCR 解析などによる発現解析を行った。また甲状腺がん、卵巣がんについてもマイクロアレイによる発現データと病理学的因子との関連を検討した。さらに乳がん幹細胞における PRDM14 の機能解析のため、手術摘出組織を用いた primary culture を行い、sphere 形成細胞を作製した。また、同薬剤の薬効のバイオマーカーとなるコンパニオン診断薬を開発することを目的とし、乳がん臨床組織における網羅的な遺伝子発現解析により得られた発現情報から PRDM14 の発現と強い相関関係をもつ分泌タンパクを同定した後、ELISA 法などを用いて検討を行った。また、サスペンションアレイキットを用いた、網羅的サイトカイン定量を行い、PRDM14 遺伝子発現量と強い相関をもつ遺伝子群の同定を行った。

A. 研究目的：

近年、患者数が増加し社会的に解決が急務である「乳がん」を対象に、がん幹細胞において高い発現量を認める PRDM14 を標的とした核酸治療薬が開発されつつある。研究目標の達成には、PRDM14 を標的とした核酸治療に適合する乳癌患者の層別化を行うことが不可欠である。本研究では、難治性乳がん、膵がんの治療成績向上のため、PRDM14 標的治療薬の開発を促進すると同時に、PRDM14 の発現量と強く相関する分泌タンパクを同定することで、実用的な薬効バイオマーカーを同定し、臨床応用可能なコンパニオン診断薬の開発を目指すことを目的とした。

B. 研究方法：

- ① 組織型、予後、治療歴、薬剤反応性、副作用など臨床情報を有する凍結乳がん組織より mRNA を抽出し、quality check を行った。
- ② 網羅的な乳がん遺伝子発現プロファイルを解析するためにマイクロアレイ解析を行った。
- ③ PRDM14 遺伝子発現量と強い相関をもつ分泌タンパク遺伝子について、新たなマイクロアレイ解析により検証試験を行った。
- ④ また、新たなマイクロアレイ解析により、PRDM14 遺伝子と相関関係をもつ遺伝子を新たに同定した。
- ⑤ 乳がん、膵がん以外のがん種については、甲状腺がん、卵巣がんについても PRDM14 遺伝子発現状況を検討し、臨床病理学的因子との関連を解析した。
- ⑥ 乳がん手術摘出標本を用いて、Primary Culture により Cancer Stem cell の単離を行った。

- ⑦ マイクロアレイ解析に用いた乳がん症例の血清検体を用いて ELISA 法などを用いて、PRDM14 遺伝子発現量と相関の高い分泌タンパクの定量を行った。
- ⑧ 上述の血清を用いてマルチプレックスサスペンションアレイ解析を行い、PRDM14 遺伝子発現量と相関するサイトカインを同定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、札幌医科大学臨床研究審査委員会の承認を得て実施し、臨床検体の取り扱いについては同委員会の指針に従って行った。(承認番号 24-159) また、分担研究者の異動後は、国立がん研究センター審査委員会の承認を得て実施し、臨床検体の取り扱いについては同委員会の指針に従って行った。(研究課題番号 2014-158)

C. 研究結果：

先行研究と合わせると、これまでに乳がん臨床検体 112 例を用いた PRDM14 の発現解析が終了した。さらにこの 112 例中 79 例については独立した 2 サンプルセットにてマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現プロファイル解析が行われた。マイクロアレイ解析結果より PRDM14 遺伝子の発現量と相関を有し、かつ分泌タンパクをコードする遺伝子として、ENOX2 (Ecto-NOX Disulfide-Thiol Exchanger 2) 遺伝子が同定された (相関係数  $r=0.75$ )。乳がん組織における PRDM14 遺伝子の発現量と同一乳がん患者の血清を用いて、ELISA 法にて血中 ENOX2 タンパクの定量を行ったが、乳がん組織の遺伝子発現量と ENOX2 タンパク量の間に有意な相関を認めなかった。また、血中 CEA タンパク量と同一患者の乳がん組織における PRDM14 の発現量を検討したが、有意な相関を認

めなかった。現在マルチプレックスサスペンションアレイによる血中サイトカイン発現量解析結果と乳がん PRDM14 遺伝子発現量の間で関連解析を行っている。

PRDM14 の他がん種における発現状況については、甲状腺がん臨床検体においては 21 症例中 17 症例で正常甲状腺濾胞上皮細胞に比べ、PRDM14 の高発現を認めたが、組織型との関係は明らかではなかった。

卵巣がん臨床検体においては、21 例中 11 例で正常卵巣表層上皮細胞に比べ、PRDM14 の高発現を認めたが、組織型との関係は明らかではなかった。

また乳がん手術摘出標本 11 検体を用いて Primary Culture を行い、9 症例について乳がん幹細胞の存在が示唆される、sphere 形成を確認した。

#### D. 考察：

乳がん追加臨床検体を用いた qRT-PCR による検討やマイクロアレイ解析の結果から、PRDM14 の乳がんにおける特異的高発現の再現性が確認された。

また、PRDM14 の発現とリンパ管侵襲や脈管侵襲の間に関連がある可能性があり、PRDM14 は細胞浸潤能とも関係している可能性が示された。他臓器がんでの PRDM14 の発現については、甲状腺がんにおいて高発現を認める傾向が示された。

乳がん幹細胞および膵がんにおいて高い発現量を認める転写因子 PRDM14 遺伝子は転写制御を受ける遺伝子がいくつか報告されてはいるものの、PRDM14 による転写制御を受けることが知られていない、未知の遺伝子が多数存在し得ることが推測されている。PRDM14 遺伝子は分泌タンパクである可能性は低く、血中 PRDM14 タンパクを定量化した報告は存在しない。そのため、PRDM14 の発現量と強い相関を有する分泌タンパク、つまり PRDM14 発現量の surrogate marker を同定することは、薬剤耐性を示す難治性の乳がんや膵がんに対する適切な治療法を選択するうえで、非常に臨床有用性が高いものと期待されている。マイクロアレイ解析結果および qRT-PCR により、PRDM14 遺伝子の発現量と強い相関を示す遺伝子を同定したが、これらの遺伝子発現量は、必ずしも血清中のタンパク量と相関を示すとは限らないことが明らかとなった。サスペンションアレイの結果より、PRDM14 遺伝子発現量と相関を示す候補遺伝子が同定されつつある。

#### E. 結論：

乳がん臨床組織を用いた初代培養の結果、乳がん幹細胞の存在を示す sphere 形成を認め、今後乳がん幹細胞を用いた解析により、PRDM14 遺伝子を標的とした治療薬の臨床有用性が深まるものと期待される。マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現情報より、PRDM14 遺伝子の発現量と強い相関を示す候補分泌タンパク遺伝子を同定した。今後これらの候補タンパクについて ELISA などの血中タンパ

ク定量により、PRDM14 の surrogate marker となるようなタンパクを検出するための血中マーカー測定系を確立することで、より有効性の高い新たな乳がん分子標的治療法を開発する予定である。

#### F. 研究発表：

##### 1. 論文発表

- 1: Wheeler HE, Gamazon ER, Wing C, Njiaju UO, Njoku C, Baldwin RM, Owzar K, Jiang C, Watson D, Shterev I, Kubo M, Zembutsu H, Winer EP, Hudis CA, Shulman L, Nakamura Y, Ratain MJ, Kroetz D, Cox NJ, Dolan ME. Integration of cell line and clinical trial genome-wide analyses supports a polygenic architecture of paclitaxel-induced sensory peripheral neuropathy. *Clin Cancer Res*. 2013 Jan 15;19(2):491-9.
- 2: Nyholt DR, Low SK, Anderson CA, Painter JN, Uno S, Morris AP, Macgregor S, Gordon SD, Henders AK, Martin NG, Attia J, Holliday EG, McEvoy M, Scott RJ, Kennedy SH, Treloar SA, Missmer SA, Adachi S, Tanaka K, Nakamura Y, Zondervan KT, Zembutsu H, Montgomery GW. Genome-wide association meta-analysis identifies new endometriosis risk loci. *Nat Genet*. 2012 Oct 28;44(12):1355-9.
- 3: Elgazzar S, Zembutsu H, Takahashi A, Kubo M, Aki F, Hirata K, Takatsuka Y, Okazaki M, Ohsumi S, Yamakawa T, Sasa M, Katagiri T, Miki Y, Nakamura Y. A Genome-wide association study identifies a genetic variant in the SIAH2 locus associated with hormonal receptor-positive breast cancer in Japanese. *J Hum Genet*. 2012 Dec;57(12):766-71.
- 4: Baldwin RM, Owzar K, Zembutsu H, Chhibber A, Kubo M, Jiang C, Watson D, Eclov RJ, Mefford J, McLeod HL, Friedman PN, Hudis CA, Winer EP, Jorgenson EM, Witte JS, Shulman LN, Nakamura Y, Ratain MJ, Kroetz DL. A genome-wide association study identifies novel loci for paclitaxel-induced sensory peripheral neuropathy in CALGB 40101. *Clin Cancer Res*. 2012 Sep 15;18(18):5099-109.
- 5: Cha PC, Zembutsu H, Takahashi A, Kubo M, Kamatani N, Nakamura Y. A genome-wide association study identifies SNP in DCC is associated with gallbladder cancer in the Japanese population. *J Hum Genet*. 2012 Apr;57(4):235-7.
- 6: Kiyotani K, Uno S, Mushiroda T, Takahashi A, Kubo M, Mitsuhashi N, Ina S, Kihara C, Kimura Y, Yamaue H, Hirata K, Nakamura Y, Zembutsu H. A genome-wide association study identifies four genetic markers for

- hematological toxicities in cancer patients receiving gemcitabine therapy. *Pharmacogenet Genomics*. 2012 Apr;22(4):229-35.
- 7: Low SK, Takahashi A, Cha PC, Zembutsu H, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y. Genome-wide association study for intracranial aneurysm in the Japanese population identifies three candidate susceptible loci and a functional genetic variant at EDNRA. *Hum Mol Genet*. 2012 May 1;21(9):2102-10.
- 8: Kiyotani K, Mushiroda T, Tsunoda T, Morizono T, Hosono N, Kubo M, Tanigawara Y, Imamura CK, Flockhart DA, Aki F, Hirata K, Takatsuka Y, Okazaki M, Ohsumi S, Yamakawa T, Sasa M, Nakamura Y, Zembutsu H. A genome-wide association study identifies locus at 10q22 associated with clinical outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients in Japanese. *Hum Mol Genet*. 2012 Apr 1;21(7):1665-72.
- 9: Chhibber A, Mefford J, Stahl EA, Pendergrass SA, Baldwin RM, Owzar K, Li M, Winer EP, Hudis CA, Zembutsu H, Kubo M, Nakamura Y, McLeod HL, Ratain MJ, Shulman LN, Ritchie MD, Plenge RM, Witte JS, Kroetz DL. Polygenic inheritance of paclitaxel-induced sensory peripheral neuropathy driven by axon outgrowth gene sets in CALGB 40101 (Alliance). *Pharmacogenomics J*. 2014 Feb 11. doi: 10.1038/tpj.2014.2. [Epub ahead of print] PMID:24513692[PubMed - as supplied by publisher]
- 10: Province MA, Goetz MP, Brauch H, Flockhart DA, Hebert JM, Whaley R, Suman VJ, Schroth W, Winter S, Zembutsu H, Mushiroda T, Newman WG, Lee MT, Ambrosone CB, Beckmann MW, Choi JY, Dieudonné AS, Fasching PA, Ferraldeschi R, Gong L, Haschke-Becher E, Howell A, Jordan LB, Hamann U, Kiyotani K, Krippel P, Lambrechts D, Latif A, Langsenlehner U, Lorzio W, Neven P, Nguyen AT, Park BW, Purdie CA, Quinlan P, Renner W, Schmidt M, Schwab M, Shin JG, Stingl JC, Wegman P, Wingren S, Wu AH, Ziv E, Zirpoli G, Thompson AM, Jordan VC, Nakamura Y, Altman RB, Ames MM, Weinshilboum RM, Eichelbaum M, Ingle JN, Klein TE. CYP2D6 Genotype and Adjuvant Tamoxifen: Meta-Analysis of Heterogeneous Study Populations. *Clin Pharmacol Ther*. 2013 Sep 23. doi: 10.1038/clpt.2013.186. [Epub ahead of print] PMID: 24060820 [PubMed - as supplied by publisher]
- 11: Chung S, Low SK, Zembutsu H, Takahashi A, Kubo M, Sasa M, Nakamura Y. A genome-wide association study of chemotherapy-induced alopecia in breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2013 Sep 11;15(5):R81. [Epub ahead of print] PMID: 24025145 [PubMed - as supplied by publisher]
- 12: Kiyotani K, Mushiroda T, Zembutsu H, Nakamura Y. Important and critical scientific aspects in pharmacogenomics analysis: lessons from controversial results of tamoxifen and CYP2D6 studies. *J Hum Genet*. 2013 Jun;58(6):327-33. doi: 10.1038/jhg.2013.39. Epub 2013 May 9. PMID: 23657426 [PubMed - in process]
- 13: Low SK, Chung S, Takahashi A, Zembutsu H, Mushiroda T, Kubo M, Nakamura Y. Genome-wide association study of chemotherapeutic agent-induced severe
- 14: Zembutsu H. Pharmacogenomics toward personalized tamoxifen therapy for breast cancer. *Pharmacogenomics*. 2015 Mar;16(3):287-96.
- 15: Kutomi G, Ohmura T, Satomi F, Takamaru T, Shima H, Suzuki Y, Otokozawa S, Zembutsu H, Mori M, Hirata K. Lymph node shape in computed tomography imaging as a predictor for axillary lymph node metastasis in patients with breast cancer. *Exp Ther Med*. 2014 Aug;8(2):681-685.
- 16: Aguilar H, Urruticoechea A, Halonen P, Kiyotani K, Mushiroda T, Barril X, Serra-Musach J, Islam A, Caizzi L, Di Croce L, Nevedomskaya E, Zwart W, Bostner J, Karlsson E, Pérez Tenorio G, Fornander T, Sgroi DC, Garcia-Mata R, Jansen MP, García N, Bonifaci N, Climent F, Soler MT, Rodríguez-Vida A, Gil M, Brunet J, Martrat G, Gómez-Baldó L, Extremera AI, Figueras A, Balart J, Clarke R, Burnstein KL, Carlson KE, Katzenellenbogen JA, Vizoso M, Esteller M, Villanueva A, Rodríguez-Peña AB, Bustelo XR, Nakamura Y, Zembutsu H, Stål O, Beijersbergen RL, Pujana MA. VAV3 mediates resistance to breast cancer endocrine therapy. *Breast Cancer Res*. 2014 May 28;16(3):R53.
- 17: Chhibber A, Mefford J, Stahl EA, Pendergrass SA, Baldwin RM, Owzar K, Li M, Winer EP, Hudis CA, Zembutsu H, Kubo M, Nakamura Y, McLeod HL, Ratain MJ, Shulman LN, Ritchie MD, Plenge RM, Witte JS, Kroetz DL. Polygenic inheritance of paclitaxel-induced sensory peripheral neuropathy driven by axon outgrowth gene sets in CALGB 40101 (Alliance). *Pharmacogenomics J*. 2014 Aug;14(4):336-42

18: Province MA, Goetz MP, Brauch H, Flockhart DA, Hebert JM, Whaley R, Suman VJ, Schroth W, Winter S, Zembutsu H, Mushiroda T, Newman WG, Lee MT, Ambrosone CB, Beckmann MW, Choi JY, Dieudonné AS, Fasching PA, Ferraldeschi R, Gong L, Haschke-Becher E, Howell A, Jordan LB, Hamann U, Kiyotani K, Krippel P, Lambrechts D, Latif A, Langsenlehner U, Lorizio W, Neven P, Nguyen AT, Park BW, Purdie CA, Quinlan P, Renner W, Schmidt M, Schwab M, Shin JG, Stingl JC, Wegman P, Wingren S, Wu AH, Ziv E, Zirpoli G, Thompson AM, Jordan VC, Nakamura Y, Altman RB, Ames MM, Weinshilboum RM, Eichelbaum M, Ingle JN, Klein TE; International Tamoxifen Pharmacogenomics Consortium. CYP2D6 genotype and adjuvant tamoxifen: meta-analysis of heterogeneous study populations. *Clin Pharmacol Ther.* 2014 Feb;95(2):216-27.

19: ゲノムワイド関連解析によるジェムシタビン副作用関連遺伝子の同定

前佛 均, 清谷 一馬, 宇野 智子, 木村 康利, 筵田 泰誠, 光畑 直喜, 伊奈 志乃美, 鬼原 史, 山上 裕機, 平田 公一, 中村 祐輔, 胆と膝(0388-9408)34 巻 2 号 Page143-148(2013.02)

20: 前佛 均, 清谷 一馬, 宇野 智子, 木村 康利, 筵田 泰誠, 光畑 直喜, 伊奈 志乃美, 鬼原 史, 山上 裕機, 平田 公一, 中村 祐輔. What's New in SURGERY FRONTIER(第77回) ゲノム医学の新情報 遺伝子解析による薬物反応性 有害事象 ゲノムワイド関連解析によるジェムシタビン副作用関連遺伝子の同定. *Surgery Frontier* (1340-5594)20巻2号 Page198-201(2013.06)

21: 加藤 陽一郎(岩手医科大学 泌尿器科学講座), 高田 亮, 岩崎 一洋, 小原 航, 藤岡 知昭, 前佛 均, 中村 祐輔. What's New in SURGERY FRONTIER(第77回) ゲノム医学の新情報 遺伝子解析による薬物反応性 抗腫瘍効果 浸潤性膀胱癌に対する術前化学療法 感受性予測システムの構築. *Surgery Frontier*(1340-5594)20 巻2号 Page194-197(2013.06)

22: 宇野 智子, 前佛 均, 中村 祐輔. What's New in SURGERY FRONTIER(第77回) ゲノム医学の新情報 ゲノムワイド関連解析による疾病関連遺伝子の同定 子宮内膜症. *Surgery Frontier* (1340-5594)20巻2号 Page184-187(2013.06)

23: 中島 光子, 前佛 均. What's New in SURGERY FRONTIER(第77回) ゲノム医学の新情報 ゲノムワイド関連解析による疾病関連遺伝子の同定 ケロイド. *Surgery Frontier*(1340-5594)20 巻2号 Page178-183(2013.06)

24: Zembutsu H. Precision Medicine for Cancer and Pharmacogenomics. 血液内科 2015 in press.

## 2. 学会発表

1:ゲノムワイド関連解析によるジェムザール副作用関連遺伝子の同定, 前佛 均, 清谷 一馬, 宇野 智子, 筵田 泰誠, 光畑 直喜, 木村 康利, 山上 裕機, 平田 公一, 中村 祐輔, 日本人類遺伝学会 第 57 回大会, 東京(2012.10)

2: ゲノムワイド関連解析による膀胱癌発症関連遺伝子およびジェムシタビン副作用関連遺伝子の同定, 前佛 均, 口羽 文, Siew-Kee Low, 清谷 一馬, 宇野 智子, 筵田 泰誠, 久保 充明, 平田 公一, 木村 康利, 山上 裕機, 吉田 輝彦, 坂本 裕美, 中村 祐輔, 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市(2012.09)

3:局所浸潤性膀胱癌に対するネオアジュバント療法感受性予測前向き試験, 加藤 陽一郎, 前佛 均, 高田 亮, 岩崎 一洋, 小原 航, 角田 達彦, 中村 祐輔, 藤岡 知昭, 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市 (2012.09)

4:遺伝子発現プロファイルに基づく乳がん術前化学療法感受性予測システムの構築, 鈴木 やすよ, 前佛 均, 西舘 敏彦, 植木 知身, 九富 五郎, 高丸 智子, 平田 公一, 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌市 (2012.09)

5: 遺伝子診断による乳癌オーダーメイド医療, 前佛 均, 平田 公一, 安井 寛, 神津 英至, 和田 卓郎, 第 3 回日本プライマリ・ケア連合学会学術大会, 福岡市 (2012.9.2)

6:CYP2D6 遺伝子多型による TAM 投与量調節治療, 笹 三徳, 清谷 一馬, 筵田 泰誠, 今村 知世, 谷川原 佑介, 細野 直哉, 前佛 均, 中村 祐輔, 第 20 回日本乳癌学会総会、熊本市 (2012.06)

7: A replication study of a GWAS identified three genetic loci associated with clinical outcomes of patients with invasive breast cancer, Goro Kutomi, Koichi Hirata, Kazuma Kiyotani, Taisei Mushiroda, Tatsuhiko Tsunoda, Fuminori Aki, Yuichi Takatsuka, Minoru Okazaki, Shozo Ohsumi, Takashi Yamakawa, Mitsunori Sasa, Yusuke Nakamura and Hitoshi Zembutsu, 第72回日本癌学会学術総会, 横浜市 (2013.10)

8: A prospective study to examine the availability of the prediction system of Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle Invasive Bladder Cancer. Yoichiro Kato, Hitoshi Zembutsu, Ryo Takata, Kazuhiro Iwasaki, Wataru Obara, Yusuke Nakamura, Tomoaki Fujioka, 第

72回日本癌学会学術総会, 横浜市 (2013.10)

9: Genome-wide association studies identify different susceptibility loci for various subtypes of epithelial ovarian cancer in the Japanese population. Hitoshi Zembutsu, Pei-Chieng Cha, Akira Hirasawa, Atsushi Takahashi, Tomoko Akahane, Siew-Kee Low, Michiaki Kubo, Daisuke Aoki, Yusuke Nakamura, 第72回日本癌学会学術総会, 横浜市 (2013.10)

10: Prospective Clinical Study to Clarify the Relationship between CYP2D6 Genotype and the Therapeutic Effects of Preoperative Tamoxifen Therapy. Hitoshi Zembutsu, Seigo Nakamura, Sadako Akashi, Takashi Kuwayama, Tomoko Takamaru, Chie Watanabe, Hiroyuki Takei, Takashi Ishikawa, Soo Chin Lee, Ching Chan, Yasuaki Sagara, Ayami Matsukata, Minoru Okazaki, Hiroshi Matsumoto, Tousei Ohmura, Goro Kutomi, Hiroaki Shima, Atsushi Watanabe, Koichi Hirata, and Yusuke Nakamura, 日本人類遺伝学会 第58回大会, 仙台市(2013.11)

11: ゲノムワイド関連解析によるタモキシフェン反応性診断. 前佛 均, 平田 公一, 岡崎 稔, 安藝 史典, 高塚 雄一, 大住 省三, 山川 卓, 笹 三徳, 中村 祐輔, 日本外科学会 第113回大会, 福岡 (2013.4)

12: A genome-wide association study (GWAS) of docetaxel-induced peripheral neuropathy in CALGB 90401 (Alliance). Daniel Louis Hertz, Kouros Owzar, Susan Halabi, William Kevin Kelly, Hitoshi Zembutsu, Chen Jiang, Jai Narendra Patel, Dorothy Watson, Ivo Shterev, Deanna L. Kroetz, Paula N. Friedman, John Francis Mahoney, Michael Anthony Carducci, Michael J. Kelley, Eric Jay Small, Phillip G.

Febbo, Yusuke Nakamura, Michiaki Kubo, Mark J. Ratain, Howard L. McLeod. 2013 ASCO Annual Meeting.

13: 前佛 均, 中村 清吾, 明石 定子, 桑山 隆志, 渡邊 知映, 武井 寛幸, 石川 孝, 長谷川 善枝, リー スーチン, 松方 絢美, 松本 広志, 九富 五郎, 中村 祐輔. CYP2D6 genotypeとタモキシフェン治療反応性の関係を解明する多施設共同前向き研究. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜市 (2014.9)

14: 高田 亮, 加藤 陽一郎, 前佛 均, 片桐 豊雅, 角田 達彦, 藤岡 知昭, 中村 祐輔, 小原 航網 羅的遺伝子発現解析による筋層浸潤性膀胱がんのオーダーメイド医療. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜市 (2014.9)

15: 清谷 一馬, 薙田 泰誠, 前佛 均, 中村 祐輔. PGxによるタモキシフェン治療効果予測: CYP2D6研究から学ぶこと. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜市 (2014.9)

16: 前佛 均, 中村 清吾, 明石 定子, 桑山 隆志, 渡邊 知映, 武井 寛幸, 石川 孝, 長谷川 善枝, リー スーチン, 松方 絢美, 松本 広志, 九富 五郎, 中村 祐輔. CYP2D6 genotypeとタモキシフェン治療反応性の関係を解明する多施設共同前向き研究. 日本人類遺伝学会 第59回大会, 東京都 (2014.11)

H. 知的財産権の出願・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

麻疹ウイルスベクターを用いた乳癌幹細胞特異的PRDM14分子標的  
新規癌治療法の開発に関する研究

研究分担者 谷 憲三郎 九州大学 生体防御医学研究所 教授

研究要旨

麻疹ウイルスは癌治療用ベクターとして様々な利点を有している可能性が高いと考えられる。我々は安全性の確立された弱毒化麻疹ウイルスに乳癌特異的な二つの分子、すなわち腫瘍細胞標的化遺伝子と発癌関連遺伝子標的 RNAi を付与し、この二重の腫瘍特異的機能を有する麻疹ウイルスベクターの有効性と安全性を最大限に活用した新規乳癌治療法の開発を目指した研究を実施した。

我々が治療の標的と考えている X は、乳癌臨床検体での高い発現が報告されている。我々は、もう一つの標的である細胞表面分子 Y との高い発現相関性を確認した。

そこで我々は、Y に対する一本鎖抗体(single chain Fv; scFv)遺伝子を導入することで、乳癌細胞のみに選択的に感染する新規組換え麻疹ウイルスの作製を進めた。さらに、ウイルスゲノム中に組込んだ X 遺伝子標的 RNAi により X 遺伝子の発現を阻害し、癌細胞の増殖を特異的に抑制する新たな分子標的薬剤の開発に取り組み、その骨格を完成させた。

今後、さらに試験管内、生体内における検証を重ね、乳癌幹細胞を制御することで乳癌根治を目標とした臨床応用へと発展することが期待される。

A. 研究目的

核酸医薬の臨床応用においては安全で効率的なドラッグデリバリーシステムの構築が不可欠であるが、麻疹ウイルスは生活環が細胞質にあるため、オンコウイルスベクターで問題視されている核内染色体への遺伝子挿入変異によるゲノム毒性のリスクを回避できる可能性が高い。また、ウイルスゲノム中に外来遺伝子を複数個組込むことで、腫瘍細胞中へ治療遺伝子を運び、癌関連遺伝子発現を制御させるベクターとしても有望と考えられる。さらにスターシステム(Nat Biotech 2004, Nat Biotech 2005)を利用して、正常細胞ではなく、特定の腫瘍細胞にのみ感染するウイルスを構築することが可能である。我々は、本来ワクチンとして開発され、安全性が確立されている弱毒化麻疹ウイルスを用いた、新規麻疹ウイルスベクターの開発を進めてきている。

治療標的としている X は乳癌幹細胞性に関与し

(Cancer Res, 2007)、Y は乳癌幹細胞の発現にほぼ一致していることが既に報告されており(J Clin Invest, 2012)、乳癌におけるこれら二つの分子の特性は極めて高いと考えられる。本研究の目的は、安全性が確認されている弱毒化麻疹ウイルスをベクターとして使い、これら二分子を標的とすることで、再発・遠隔転移が問題となっている、既存治療に抵抗性の難治性乳癌に対する新規分子標的薬剤開発を目的としている。

B. 研究方法

ワクチン株 Edmonston 麻疹ウイルスは、CD46, CD150 および Nectin4 レセプターを介して宿主細胞に感染する。腫瘍標的麻疹ウイルスを構築するためには、ウイルス親和性を排除すること、そして新しい腫瘍特異的親和性を導入する二つのステップが必要となる。そこで、H 蛋白への遺伝子変異の導入によって親和性を排除したウイルスは、すべての宿主細胞に感染することが不可能と



なる。これに対し、親和性の排除と同時に腫瘍特異的に結合するリガンドを導入したウイルスは、特定の標的分子を介して癌細胞にのみ感染することが可能となる。リガンドとしては、標的分子に対して高い特異性と親和性を併せ持つ一本鎖抗体 (single chain Fv: scFv) を使用することとした。この scFv は、抗体が抗原を認識するために必要な最小単位である VH(重鎖可変領域)および VL(軽鎖可変領域)から構成される可変領域 (Fv) を、フレキシブルなペプチドリンカーで結合した単鎖可変領域フラグメントである。我々の研究室に在籍した中村は、野生株とワクチン株のウイルス H 蛋白の遺伝子解析やリバースジェネティクス法を用いて、CD46 と CD150 レセプターの結合に関与するアミノ酸を同定している。これを基にして H 蛋白に点変異を導入し、乳癌幹細胞に高発現する標的分子 Y に結合する scFv を、リンカーとともに、この変異 H 蛋白の細胞外 C 末端に連結することとした。

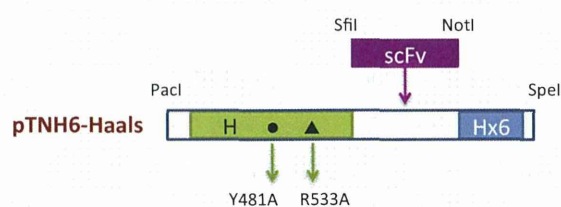


図 1. 麻疹ウイルス H 蛋白への遺伝子変異導入と一本鎖抗体導入による親和性の改変

### 1. ヒト乳癌細胞株における X と Y の発現およびその相関性の解析

ヒト臨床検体乳癌細胞で高い発現が示されている X と Y について、これら二つの分子の発現に相関性がみられるかを確認した。

まず、フローサイトメトリー法により、細胞における X と Y 蛋白の発現を確認した。Y の発現については、Purified mouse anti-human disialoganglioside Y (BD) 及び Polyclonal goat anti-mouse immunoglobulins/ RPE goat F(ab')<sub>2</sub> (Dako) を用いた。多重染色をする場合、次に mouse IgG polyclonal antibody (Southern

Biotech) を用いてブロッキングを施し、その後に anti-CD44-FITC mAbs, anti-CD24- PerCP Cy5.5 mAbs (Tombo Biosciences) を用いて細胞表面の染色を行った。さらに、X の発現を確認するために、Cytofix/ Cytoperm™ Kit (BD) を用い、anti-X antibody (Abgent) 及び APC labeled donkey anti-rabbit IgG antibodies (Molecular Probes) にて細胞内染色を行った。

### 2. 抗 Y 抗体 scFv の作製

一本鎖抗体により標的分子候補を Y とし、マウス Y-scFv の配列情報を Memorial Sloan-Kettering Cancer Center の Nai-Kong V. Cheung 教授よりご厚意でいただき、その情報をもとに遺伝子合成を行った。

同時に、ヒト Y-scFv 抗体の作製を行った。

まず、抗原としてヒト Y (Merk Millipore) に Ethanol を加えて超音波処理を施し、ミセル化したものに BSA fatty acid free (Sigma) を加えて Y-BSA 複合体を作製した。ヒト末梢血単核球に対し、この Y-BSA 複合体を体外免疫した。免疫後の細胞より total RNA を抽出して逆転写反応を行い、cDNA を合成した。これより抗体遺伝子の V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub> 領域を増幅し、一本鎖抗体遺伝子を構築した。

pMAL ベクターへ一本鎖抗体遺伝子を挿入し、形質転換体を取得後、24 時間培養して集菌し、PBS で菌体破碎をして、その上清を用いて ELISA スクリーニング試験を実施した。結果をもとに Test Clone を選択し、10ml の小スケール培養を行い、Amylose Resin カラムを用いたアフィニティ精製を行った上で、さらに抗体活性を確認した。活性確認の結果から、最終的に使用する抗体を選択した。

### 3. 抗 Y 抗体 scFv の機能解析

複数の候補ヒトおよびマウス scFv を麻疹ウイルス H タンパク質発現ベクター pTNH6-H (Nakamuraら, Nat. Biotech., 23:209, 2005) に挿入し、これらのキメラ H 蛋白の中から、腫瘍標的麻疹ウイ

ルスを構築するうえで、最適な変異の組み合わせをスクリーニングした。ウイルスレセプター陽性細胞に、H 蛋白と F 蛋白を発現するプラスミドをコトランスフェクションすると、細胞融合を誘導し、多核巨細胞を形成する。この特性を利用し、ウイルスレセプターである CD46、CD150 を発現する Vero 細胞、または標的分子である Y を発現する細胞株に、各キメラ H 蛋白と F 蛋白を発現させ、CD46、または CD150 発現 Vero 細胞ではなく、Y 発現細胞のみで細胞融合を示すものをスクリーニングした。

#### 4. ウイルスの作出（レスキュー）と増殖

麻疹ウイルスのゲノム全長をコードするプラスミドから感染性ウイルスを作出する方法（リバーシジェネティクス法）は確立されている。それゆえ、ワクチン株麻疹ウイルスの H 遺伝子を標的細胞融合キメラ H 遺伝子に変換すれば、腫瘍細胞特異的に感染するウイルスの作出が理論上可能となる。従来のリバーシジェネティクス法によって作出される麻疹ウイルスは、その H 蛋白質の CD46 ウイルスレセプターへの吸着を介して、CD46 陽性 Vero 細胞（アフリカミドリザル腎臓由来）で作出、増殖される。しかし、腫瘍標的麻疹ウイルスの場合は、H 蛋白に変異が導入され、CD46 レセプターに対する親和性を排除されているため、通常のリバーシジェネティクス法はレスキュー、増殖させることはできない。この問題を解決させるため、H 蛋白にヒスチジンタグを挿入し、このタグを認識する偽レセプター分子を Vero 細胞に発現させる「スターシステム」を中村は開発している。ウイルスゲノムの H 遺伝子には、①CD46 および CD150 レセプターに対する親和性を排除するための二つのアミノ酸変異の導入、②標的分子 GD2 に結合する scFv をコードする遺伝子の挿入、③六つのヒスチジンタグ (Hx6) をコードする遺伝子の挿入が加えられている。スターシステムでは、腫瘍標的ウイルスが CD46（および CD150）を認識することができなくても、ヒスチジンタグを介して

Vero 細胞のためレセプター分子を吸着し、感染、増殖することが可能となる。

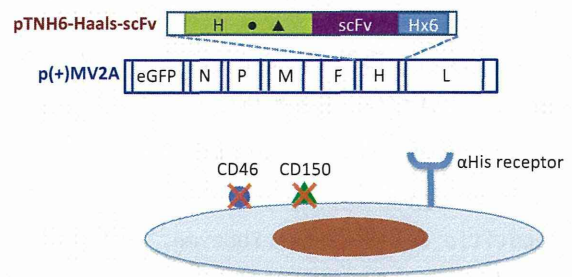


図 2. 標的化麻疹ウイルスの作出

組換え H 遺伝子を持つウイルスゲノムから、スターシステムによってウイルスがレスキューされる。

#### 5. 麻疹ウイルスによる X-RNAi の検討

RNA 干渉 (RNAi) 法とは、相補的な塩基配列をもつ遺伝子の機能を抑制する方法であり、これを応用した RNAi 医薬は次世代の分子標的治療として大きく期待されている。合成 small interfering RNA (siRNA) の導入では RNAi の効果が一過性であるため、RNAi の効果を高効率でかつ長期的に持続させることを期待するため、short hairpin RNA (shRNA) を麻疹ウイルスベクターに組み込み、細胞内へ導入する計画を立てた。通常、shRNA は核外に輸送されたのち Dicer によってループ配列が切断されて二本鎖 siRNA となり、RNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれ、RNAi の効果をもつと考えられている。しかしながら、麻疹ウイルスベクターは細胞質内でのみ増殖するため、Dicer による切断が期待できない。そこで、麻疹ウイルスベクターを用いた PRDM14-shRNA が RISC に取り込まれるために、リボザイム (Ribozyme) の配列を用いて shRNA が切断されるようにデザインすることにした。

リボザイムとは、触媒作用をもつリボ核酸 (RNA) のことで、RNA 分子を特定の部位で切断したり、低分子の物質と結合させる働きを持つ。Cech らの発見以降、1987 年ころまでに多くの新しいタイプのリボザイムが発見されているが、そのうちの

つに自己切断 RNA があり、その代表的なものとしてハンマーヘッド型またはヘアピン型リボザイムと呼ばれるものがある。この特性を利用して、PRDM14-shRNA を設計することとした。つまり、PRDM14-shRNA 配列の 5 末端側にハンマーヘッドリボザイム (Hammerhead ribozyme: HHRz)、そして 3 末端側に D 型肝炎ウイルスリボザイム (Hepatitis delta virus ribozyme: HDVRz) を配する RNA を設計し、自己切断後に shRNA が放出され、RISC に取り込まれるようにするものである。本研究代表である谷口は、複数の PRDM14 に対する shRNA 配列候補を見出しており、その情報をもとに、麻疹ウイルスに組込むのに最適な条件を検討し、発現プラスミドコンストラクトを作成した。

### C. 研究結果

#### 1. ヒト乳癌細胞株における X と Y の発現およびその相関性の解析

##### ① フローサイトメトリー法により CA1d 細胞における X および Y タンパクの発現解析

正常乳腺細胞株 MCF-10A に癌遺伝子である Ha-ras 遺伝子を導入した CA1d 細胞において、Y 発現は X 発現の高い細胞に多く認められ、またそれら  $X^{hi}Y^{hi}$  分画は、癌幹細胞に特徴的とされている  $CD44^{hi}CD24^{lo}$  を表していた。一方で、 $X^{lo}Y^{lo}$  分画は、 $CD44^{lo}CD24^{hi}$  であった。逆に、CA1d 細胞の  $CD44^{hi}CD24^{lo}$  分画には、 $X^{hi}Y^{hi}$  発現細胞が多く、一方で  $CD44^{lo}CD24^{hi}$  分画には、 $X^{hi}Y^{hi}$  の細胞がほとんど認められなかった。

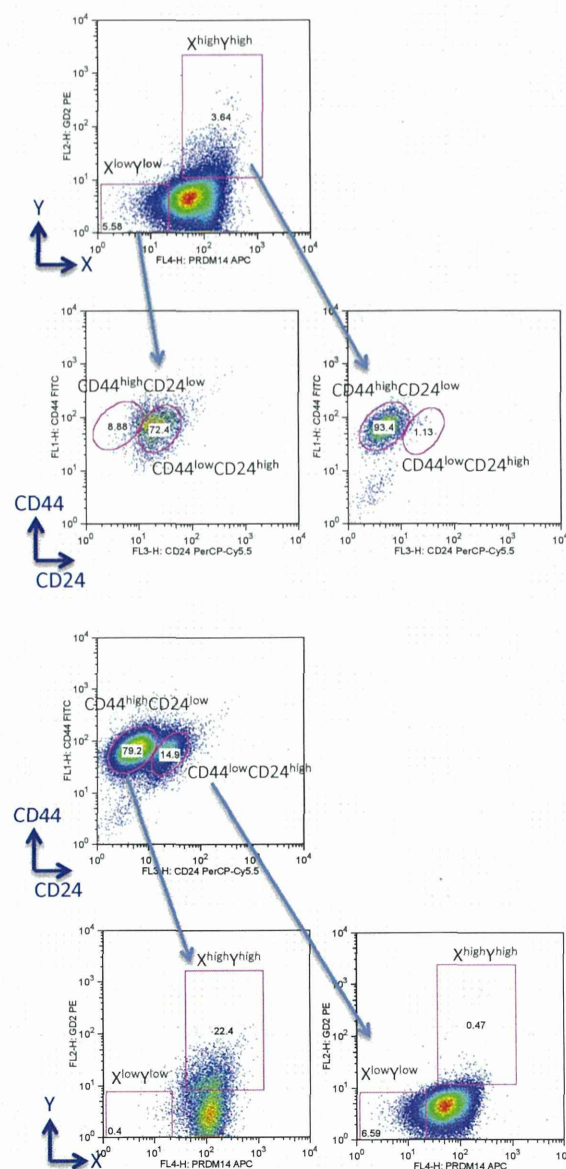


図 3. CA1d 細胞における X および Y 発現と  $CD44^{hi}CD24^{lo}$  癌細胞との相関性

#### 2. 抗 Y 抗体 scFv の作製

Y-BSA 複合体により体外免疫より得られた菌体破砕液 96 サンプルに対し、Y と BSA を抗原とした ELISA スクリーニング試験を実施したところ、複数クローンにて Y 抗原に陽性反応が認められ、かつそれらは BSA 抗原については反応性が低いことを確認した。

CDR	FR1	FR2	FR3	FR4	FR5	FR6	FR7	FR8	FR9	FR10	FR11	FR12
A	1.54179534	0.16444312	0.27392328	0.26707681	0.25129253	0.22280251	0.48179201	0.40259824	0.24451481	0.23645432	0.16252544	0.27472727
B	0.18247523	0.16302127	0.14723055	0.18861541	0.20310543	0.44144805	0.15272727	0.10080437	0.25411248	0.40004262	0.25282318	0.41812302
C	0.29513294	0.22671423	0.18624877	0.11811704	0.248	0.21575817	0.13304854	0.76284237	0.12411248	0.41224484	0.41643818	0.13888881
D	0.25738259	0.22738842	0.40622589	0.2	0.1655842	0.4029781	0.21278234	0.42071161	0.15121243	0.40412584	0.17588459	0.18328275
E	0.18176229	0.22744831	0.12812382	0.28917871	0.22627821	0.14234824	0.54837881	0.136441	0.40232381	0.13961381	0.18128881	0.41004142
F	0.17228212	0.1462751	0.40623814	0.41741414	0.21891324	0.16461711	0.42071161	0.33883881	0.25727181	0.21271774	0.4029781	0.4029781
G	0.01916212	0.11212112	0.21212112	0.21212112	0.4029781	0.21212112	0.21212112	0.21212112	0.21212112	0.21212112	0.21212112	0.21212112
H	0.21212112	0.21212112	0.21212112	0.21212112	0.21212112	0.21212112	0.21212112	0.21212112	0.21212112	0.21212112	0.21212112	0.21212112

図 4 a. 96 クローン の monoclonal MBP-scFv の抗原に対する ELISA 測定より、抗原に対する反応値 /BSA(陰性コントロール)に対する反応値が 1 以上になるものを候補クローンとした(色付項で示す)。

反応性の高いクローンについて Amylose Resin カラムを用いたアフィニティ精製を行い、SDS PAGE にてタンパクを確認したところ、MBP-scFv の存在を示す約 70kDa サイズの蛋白を認めることができた。

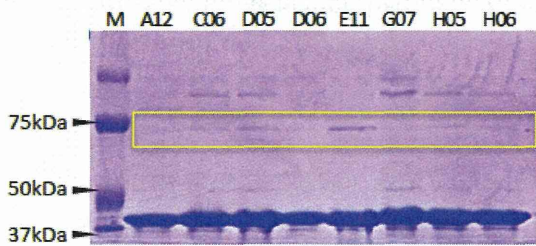


図 4 b. テストクローンの SDS PAGE 結果 MBP-scFv を示す約 70kDa のバンドが検出された。

さらに、それらの塩基配列を解析し、IgBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) にて解析したところ、それらが軽鎖および重鎖を併せ持つ一本鎖抗体の構造を呈していることが確認できた。

No.		FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	Genotype V gene
A12	VH	9	1	0	0	2	IGHV7-4-1*02
	VL	4	0	0	0	0	IGKV4-1*01
C06	VH	1	3	1	0	4	IGHV-69*69, IGHV1-69*04
	VL	2	0	0	0	0	IGLV1-40*01
D05	VH	1	3	1	0	4	IGHV-69*69, IGHV1-69*04
	VL	2	0	0	0	0	IGLV1-40*01
D06	VH	5	3	1	0	4	IGHV1-69*09
	VL	2	0	0	0	0	IGLV1-40*01
E11	VH	13	3	4	5	7	IGHV5-51*01
	VL	2	4	1	1	4	IGLV3-20*01
G07	VH	1	0	2	0	1	IGHV1-8*01
	VL	5	8	1	0	4	IGKV4-1*01
H05	VH	5	3	1	0	4	IGHV1-69*09
	VL	2	0	0	0	0	IGLV1-40*01
H06	VH	3	3	1	0	4	IGHV1-69*09
	VL	2	0	0	0	0	IGLV1-40*01

図 4 c. 図 4 b 中でナンバリングしたクローンの

DNA 配列解析結果に対して IgBLAST 解析を行い、各領域 (FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3) について、各 scFv クローンの由来となる Germline V gene (データベース) と、これと比較した際のミスマッチ塩基数を示す。

### 3. 抗 Y 抗体 scFv の機能解析

麻疹ウイルスは、そのエンベロープの全面に、H (ヘマグルチニン又は血球凝集素) タンパク質と F (膜融合) タンパク質とがスパイク状に突起して存在する。麻疹ウイルスエンベロープタンパク質は、麻疹ウイルスとその細胞受容体との相互作用に関わり、特に H タンパク質が、細胞受容体に結合する性質を持ち、F タンパク質は、細胞膜との融合に関わる。

麻疹ウイルス H タンパク質発現ベクターは、pTNH6-H (Nakamura ら、Nat. Biotech., 23:209, 2005) を用い、F タンパク質発現ベクターは、CAG プロモータ (cytomegalovirus early enhancer/chicken  $\beta$ -actin promoter) の転写制御下にある F 遺伝子を発現させるプラスミド pCAG-T7-F を用いた。pCAG-T7 は、Niwa, H. ら、Gene 108: 193-199 (1991), Okuma, K. ら、Virology 254:235-244 (1999), Richard, S. B. ら、J. Virol. 77: 8962-8972 (2003) に記載されている。

$4 \times 10^4$  の Vero, Vero/SLAM, U87 細胞を、 $1.8 \times 10^5$  の MCF10A, CA1d 細胞を 24 穴クラスターの 1 ウェルに播種し、 $0.5 \mu\text{g}$  ずつの pTNH6-H および pCAG-T7-F を、非リポソームタイプのトランスフェクション試薬 FuGENE HD (Promega) により導入した。H/F タンパク質発現プラスミドをトランスフェクトすると、細胞表面に発現した H/F タンパク質の作用により隣接する細胞との間で融合が起き、多核細胞 (合胞体) が生じる。481 番目のアミノ酸をアスパラギンからアラニンに、533 番目のアミノ酸をアルギニンからアラニンに置換したキメラ蛋白は、CD46 または CD150 ではなく、標的分子に対する scFv を介した効率のよい標的細胞融合を示した。この結果から、細胞の表面に

は機能的な H/F タンパク質が発現していることが確認された。

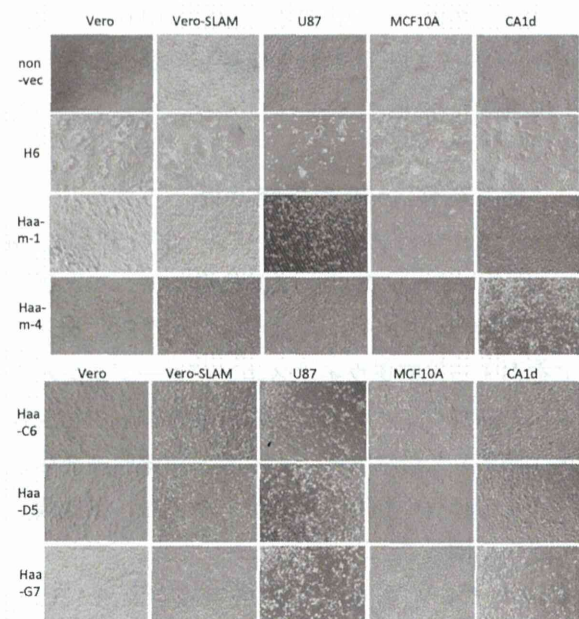


図 5 a. キメラ H 蛋白による標的細胞融合  
キメラ H 蛋白と F 蛋白による多核巨細胞が標的分子発現細胞でみられる。

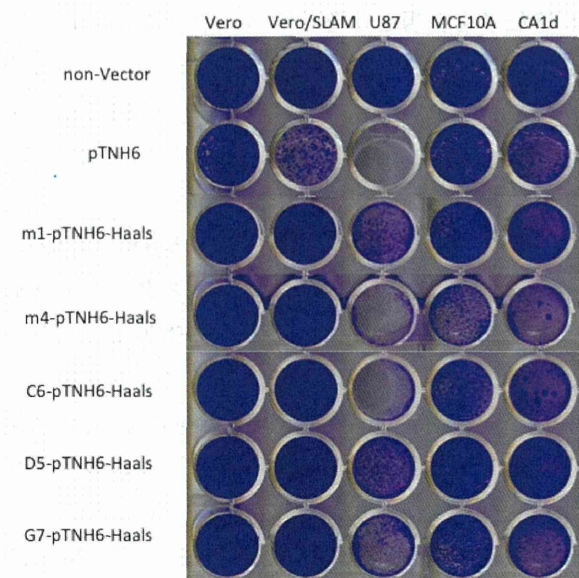


図 5 b. クリスタルバイオレット染色による生細胞数の判定

#### 4. 麻疹ウイルスによる X-RNAi の検討

X 遺伝子の発現阻害作用を介して、癌細胞の増殖を抑制するとともに、抗癌剤に対する感受性を増

大させて抗癌剤により惹起される癌細胞のアポトーシスを増強する効果を目的に、X 遺伝子の発現を阻害する shRNA を麻疹ウイルスベクターに組み込み、細胞に感染させることによって、細胞内に遺伝子を導入する。

麻疹ウイルスのゲノムの最上流には、プロモーター活性を持ったリーダー配列があり、そこから N, P, M, F, H, L の 6 つの遺伝子が並んでいる。最下流にはトレーラー配列という、ゲノムがコピーされてアンチゲノムとなった時に働くプロモーター領域が存在する。また、6 つの遺伝子のそれぞれの両末端には、転写開始配列、転写終結配列と呼ばれる短い転写の制御配列があり、さらにそれらゲノムの間には、麻疹ウイルスの場合、わずか 3 塩基の介在配列があり、それぞれのゲノムをつないでいる。そして、プロモーター配列にウイルスのポリメラーゼが結合し、各遺伝子の両末端にある転写開始、転写終結配列を認識しながら、それぞれの遺伝子情報をメッセンジャー RNA へと転写して遺伝子発現を引き起こす。我々の麻疹ウイルスアンチゲノムの N 遺伝子 3' 側の non-coding 領域に enhanced green fluorescent protein (eGFP) 遺伝子が挿入されており、eGFP 遺伝子と shRNA 配列を入れ替えることは容易で、下流の蛋白発現への影響を最小限に押さえることが可能となる。さらに、shRNA の 3' 側にハンマーヘッド型リボザイム (HHRz) を、5' 側に D 型肝炎ウイルスリボザイム (HDVRz) を挿入し、その自己切断により shRNA が遊離され、RNA-induced silencing complex (RISC) に捕捉されて silencing 効果が発揮されることを想定し、X-RNAi のためのコンストラクトを決定した。

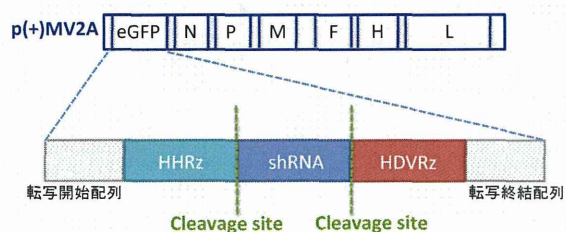


図 6. X-shRNA の構築デザイン

## D. 考察

我々が治療の標的としている X において、癌遺伝子 Ha-ras を組込んでいる CA1d 細胞における X および Y 発現解析をおこなったところ、これら二分子を発現する細胞が癌幹細胞の特徴とされる CD44<sup>hi</sup>CD24<sup>lo</sup> 分画と一致することが確認された。よって、この結果から、これら二分子を標的化することにより、既存治療法に抵抗性の乳癌幹細胞に有効性を示す可能性の高いことが示唆された。

また、乳癌幹細胞標的化のためのウイルスベクターとして用いる弱毒化した麻疹ウイルスワクチン株は、強力な抗腫瘍活性を持っているが、本来の受容体が広範囲に分布しているため、完全に腫瘍特異的であるわけではない。このことから本研究では、単鎖抗体断片を提示することによって完全に標的を改めたウイルスの回収および伝播を可能とする擬似受容体システムを用いていることにした。

乳癌幹細胞表面に発現指標的とするガングリオシド（糖脂質）に対する抗体の作製は一般的に難しいとされているが、本研究で複数クローンの候補を得ることができた。これらの候補 scFv は、DNA レベルにおいて高効率に体細胞変異が誘導されていることが確認された。

マウス scFv については、すでに有効性が確かめられている scFv の配列情報をいただき、合成して得ることができた。これらを麻疹ウイルスに導入することで、特異性および親和性の高い組換え麻疹ウイルスベクターの選択が可能となる。

次に作製したヒトとマウスの候補一本鎖抗体を麻疹ウイルスに組み込み、Y 発現乳癌細胞の標的化の可能性を検証したところ、元来のウイルス感染受容体を発現している正常細胞には何ら影響なく、標的とする Y 分子を発現している腫瘍細胞にのみ感染するウイルスベクターを構築できることが示された。

さらに、X 阻害に用いる shRNA の構築により、癌細胞の増殖を抑制すること、および癌幹細胞の抗癌剤感受性を増強する効果を検証し、実用化に向

けた試験を実施する必要がある。

## E. 結論

平成 24 年度において、本研究の治療標的として用いられる X と Y 両分子が乳癌において発現が高く、またこの二つの分子が癌幹細胞とされる細胞内に高発現していることが確認された。したがって、これら二分子を標的とすることで、高い治療効果が期待できる新規治療法の開発が可能と考えられた。

平成 25 年度は X をサイレンシングする shRNA の遺伝子配列を決定し、また、Y に対する一本鎖抗体についてヒトとマウスのものを作製した。

平成 26 年度は、候補一本鎖抗体の標的化の可能性を検証した。また、X 阻害に用いる shRNA の構築を行い、乳癌幹細胞を標的とする遺伝子組換え麻疹ウイルスベクターの基盤を完成させた。

本研究により、乳癌のための治療薬として安全に使用することができ、かつ高い治療効果が得られるものとして大いにその可能性が示唆されたが、臨床試験へ進むために、より多くの検証が必要である。引き続き、癌幹細胞を含む乳癌細胞の増殖抑制効果および抗癌剤に対する感受性を高める効果を *in vitro* および *in vivo* において検証し、医薬品への応用を目指すものである。

特許出願を鑑み、治療標的分子二つを X と Y で表現させていただきましたこと、何卒ご了承ください。

## F. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

### 1. 論文発表

- 1) Kummalue, T., Inoue, T., Miura, Y., Narusawa, M., Inoue, H., Komatsu, N., Wanachawanawin, W., Sugiyama, D., Tani, K., Ribosomal protein L11 and retinol dehydrogenase 11 induced erythroid proliferation without erythropoietin in UT-7/Epo erythroleukemic cells. *Exp Hematol.* 2015 (in press)
- 2) Hamada, K., Shirakawa, T., Terao, S., Gotoh, A., Tani, K., Huang W. Biosafety studies of carrier cells infected with a replication-competent adenovirus introduced by

IAI.3B promoter. *Mol Ther Meth Clin Develop.* 2015 (in press)

3) Narusawa, M., Inoue, H., Sakamoto, C., Matsumura, Y., Takahashi, A., Inoue, T., Watanabe, A., Miyamoto, S., Miura, Y., Hijikata, Y., Tanaka, Y., Inoue, M., Takayama, K., Okazaki, T., Hasegawa, M., Nakanishi, Y., Tani, K. TLR7 ligand augments GM-CSF-initiated antitumor immunity through activation of plasmacytoid dendritic cells. *Cancer Immunology Research.* 2(6), 568-580, 2014

4) Nii T, Marumoto T, Kawano H, Yamaguchi S, Liao J, Okada M, Sasaki E, Miura Y, Tani K. Analysis of essential pathways for self-renewal in common marmoset embryonic stem cells. *FEBS Open Bio.* 21;4:213-9, 2014

5) Yamaguchi, S., Marumoto, T., Nii T., Kawano, H., Liao, J., Nagai, Y., Okada, M., Takahashi, A., Inoue, H., Sasaki, E., Fujii, H., Okano, S., Ebise, H, Sato, T., Suyama, M., Okano, H., Miura, Y., Tani, K. Characterization of common marmoset dysgerminoma like tumor induced by the lentiviral expression of reprogramming factors. *Cancer Science.* 105(4), 402-408, 2014

6) Liao J., Marumoto, T., Yamaguchi, S., Okano, S., Takeda, N., Sakamoto, C., Kawano, H., Nii, T., Miyamoto, S., Nagai, Y., Okada, M., Inoue, H., Kawahara, K., Suzuki, A., Miura, Y., Tani, K. Inhibition of PTEN tumor suppressor promotes the generation of induced pluripotent stem cells. *Mol Ther* 21:1242-1250, 2013

7) Hiramoto, T., Ebihara, Y., Mizoguchi, Y., Nakamura, K., Yamauchi, K., Ueno, K., Nariai, N., Mochizuki, S., Yamamoto, S., Nagasaki, M., Furukawa, Y., Tani, K., Nakauchi, H., Kobayashi, M., Tsuji, K. Wnt3a stimulates maturation of Impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia patient-derived pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:3023-3028, 2013

8) Kurita, R., Suda, N., Sudo, K., Miharada, K., Hiroyama, T., Miyoshi, H., Tani, K., Nakamura, Y. Establishment of immortalized human erythroid progenitor cell lines able to produce enucleated red blood cells. *PLoS ONE* 2013

9) Yokota, Y., Inoue, H., Matsumura, Y., Nabeta, H., Narusawa, M., Watanabe, A., Sakamoto, C., Hijikata, Y., Iga-Murahashi, M., Takayama, K., Sasaki, F., Nakanishi, Y., Yokomizo, T., Tani, K. Absence of LTB4/BLT1 axis facilitates generation of mouse GM-CSF-induced long-lasting antitumor immunological memory by enhancing innate and adaptive immune systems. *Blood*

120:3444-3543, 2012

10) Miyamoto, S., Inoue, H., Nakamura, T., Yamada, M., Sakamoto, C., Urata, Y., Okazaki, T., Marumoto, T., Takahashi, A., Takayama, K., Nakanishi, Y., Shimizu, H., Tani, K. Coxsackievirus B3 Is an oncolytic virus with immunostimulatory properties that is active against lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 72:2609-2621, 2012

11) Hamada, K., Yoshihara, C., Ito, T., Tani, K., Tagawa, M., Sakuragawa, N., Ito, H., Koyama, Y. Antitumor effect of chondroitin sulfate-coated ternary granulocyte macrophage colony-stimulating factor plasmid complex for ovarian cancer. *J Gene Med.* 14:5120-127, 2012

## 2. 学会発表 (国際学会のみ)

1) Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Yumiko Matsumura, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani (2014, 11/7-11/8). The role of plasmacytoid dendritic cells in GM-CSF-based antitumor immunity. The 24th Hot Spring Harbor International Symposium, Fukuoka.

2) Chika Sakamoto, Hiroyuki Inoue, Megumi Narusawa, Yumiko Matsumura, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani (2014, 5/21-5/24). Therapeutic vaccination with irradiated GM-CSF gene-transduced cancer side population cells effectively suppress tumor growth and lung metastasis.

3) Yasuki Hijikata, Hiroyuki Inoue, Mutsunori Murahashi, Shinji Okano, Yoshihiro Tanaka, Atsushi Takahashi, Toshihiko Okazaki, Yoichi Nakanishi, Koji Yoshida, Takuya Tsunoda, Yusuke Nakamura, Kenzaburo Tani (2014, 4/5-4/9). A phase I clinical trial of RNF43 peptide-specific immune cell therapy combined with low-dose cyclophosphamide for patients with advanced solid tumors. The 105th Annual Meeting of American Association of Cancer Research, San Diego, CA, USA.

4) Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Combination use of TLR7 ligand with GM-CSF gene-transduced tumor vaccines provides substantial antitumor immunity against poorly immunogenic mouse lung cancer cells. The 16<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Salt Lake City, UT, May 15-18, 2013

5) Hiroyuki Inoue, Megumi Narusawa, Chika Sakamoto, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. Gene expression profiling identifies plasmacytoid dendritic cells as positive regulators in GM-CSF-induced antitumor immunity. The 4<sup>th</sup> Japanese Society of Hematology International Symposium 2013, Matsuyama, Japan, May 24-25, 2013

6) Chika Sakamoto, Hiroyuki Inoue, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, and Kenzaburo Tani. Therapeutic vaccine with GM-CSF gene-transduced cancer stem cells inhibits tumor growth and metastasis of breast cancer. The 23<sup>rd</sup> Hot Spring Harbor International Symposium, Recent Advances in Stem Cell Biology 2013. Fukuoka, Japan, November 4-6, 2013

7) Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Yumiko Matsumura, Atsushi Takahashi, Ayumi Watanabe, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. TLR7 ligand potentiates GM-CSF-initiated antitumor immunity through activation of plasmacytoid dendritic cells. The 53<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition. New Orleans, LA, December 10-13, 2013

8) Murahashi M, Hijikata Y, Tanaka Y, Inoue H, Marumoto T, Nakanishi Y, Yoshida K, Tsunoda Nakamura, Y, Tani K. Phase I clinical trial of cancer vaccine combined with chemotherapy targeting both tumor antigen and immune tolerance against advanced solid tumors. 37th ESMO Congress, September 2012, Vienna, Austria.

9) Hiroyuki Inoue, Yasuki Hijikata, Keisuke Yasunari, Akira Sakamoto, Shohei Miyamoto, Kaname Nosaki, Yumiko Matsumura, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered oncolytic Edmonston strain of measles virus harboring the wild-type N, P, L, Genes (MV-NPL) effectively target lung cancer stem cells. American Association of Cancer Research, 103th Annual Meeting, Chicago, 2012

10) Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Akira Sakamoto, Shohei Miyamoto, Kaname Nosaki, Yumiko Matsumura, Takafumi Nakamura, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered Measles virus Edmonston strain expressing the wild-type N, P, L Genes (MV-NPL) is a promising oncolytic virotherapy agent against lung cancer stem cells. American Society of

Gene and Cell Therapy, 15th Annual Meeting, Philadelphia, 2012

11) Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Yumiko Matsumura, Shohei Miyamoto, Kaname Nosaki, Akira Sakamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered oncolytic measles virus lyses non-small cell lung cancer stem cells in vitro and in vivo. Asian Pacific Lung Cancer Conference, 5th Annual Meeting, Fukuoka, 2012

12) Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Yumiko Matsumura, Shohei Miyamoto, Akira Sakamoto, Kaname Nosaki, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered oncolytic measles virus effectively targets and kills non-small cell lung cancer stem cells. Asian Pacific Society of Respiriology, 17th Annual Meeting, Hong Kong, 2012

#### G. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得
  2. 実用新案登録
  3. その他
- 特記事項なし。



## II. 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
谷口博昭	固形がんの免疫・抗体療法—基礎研究の進歩と臨床応用—抗体療法の基礎(種類、特徴など):概論		日本臨牀70巻12号	日本臨牀社	大阪	2012	2087-2092
谷口博昭	DDS研究の動向と各種がん治療におけるDDS開発へのメディカルニーズ	永井恒司	ドラッグデリバリーシステムの展開 II	シーエムシー出版	東京	2012	293-299
谷口博昭	分子標的薬—がんから他疾患までの治癒をめざして—分子標的薬の作用機序・薬理作用—がん浸潤とその抑制		日本臨牀増刊号	日本臨牀社	大阪	2012	154-158
長村文孝	FDAにおける抗がん剤の審査 医薬品/医療機器の承認申請書の上手な書き方・まとめ方		医薬品/医療機器の承認申請書の上手な書き方・まとめ方	技術情報協会	東京	2014	216-219
長村文孝	その他のがん	大木桃代	がん患者のこころに寄り添うためにサイコオンコロジーの基礎と実践	真興交易(株)医書出版部	東京	2014	92-95
長村文孝	がん関連の臨床研究	大木桃代	がん患者のこころに寄り添うためにサイコオンコロジーの基礎と実践	真興交易(株)医書出版部	東京	2014	114-117
長村文孝	FDAにおける治験・承認審査の要点と傾向	水野朝子	稀少疾患/難病の診断・治療と製品開発	技術情報協会	東京	2012	255-260

長村文孝	国内外のがんワクチンの開発動向と臨床からの期待	安保公介	ワクチンの市場動向と開発・製造実務集	技術情報協会	東京	2012	673-689
長村文孝	国内副作用情報報告からFDAへの英文副作用報告書を作成する	佐藤章弘	世界の薬事規制対応	技術情報協会	東京	2012	317-322
Hitoshi Zembutsu	Tamoxifen Pharmacogenetics.		Tamoxifen Pharmacogenetics.	The McGraw-Hill Companies		2013	In press

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
Adachi Y, Ohashi H, Imusumran A, Yamamoto H, Matsunaga Y, <u>Taniguchi H</u> , Nosho K, Suzuki H, Sasaki Y, Arimura Y, Carbone DP, Imai K, Shinomura Y.	The effect of IGF-I receptor blockade for human esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma.	<b><i>Tumor Biol</i></b> ,	35(2)	973-985	2014
Yamamoto H, Watanabe Y, Maehata T, Morita R, Yoshida Y, Oikawa R, Ishigooka S, Ozawa S, Matsuo Y, Hosoya K, Yamashita M, <u>Taniguchi H</u> , Nosho K, Suzuki H, Yasuda H, Shinomura Y, Itoh F.	An updated review of gastric cancer in the next-generation sequencing era: insights from bench to bedside and vice versa.	<b><i>World J Gastroenterol</i></b>	20	3927-3937	2014

Kato N, Yamamoto H, Adachi Y, Ohashi H, Taniguchi H, Suzuki H, Nakazawa M, Kaneto H, Sasaki S, Imai K, Shinomura Y.	Cancer detection byubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 methylation in pancreatobiliary fluids.	<i>World J Gastroenterol</i>	19(11)	1718-1727	2013
Taniguchi H, Jacinto F.V., VillanuevaA, Fernández AF, Yamamoto H, Carmona F.J, Puertas S, Marquez VE, Shinomura Y, Imai K, and Esteller M.	Silencing of the Kruppel-likefactor 2 by the histone methyltransferase EZH2 in human cancer.	<i>Oncogene</i>	31	1988-1994	2012
Ohashi K, Nagamura-Inoue T, Nagamura F, Tojo A, Miyamura K, Mori T, Kurokawa M, Taniguchi S, Ishikawa J, Morishima Y, Atsuta Y, Sakamaki H.	Effect of graft sourceson allogeneic hematopoietic stem cell transplantation outcome in adults with chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitos: a Japanese Society of Hematopoietic Cell Transplantation retrospective analysis.	<i>Int J Hematol</i>	100	296-306	2014
長村文孝	トランスレーショナル リサーチの重要性	病院	73(7)	540-544	2014
Mae H, Ooi J, Takahashi S, Kato S, Kawakita T, Ebihara Y, Tsuji K, Nagamura F, Echizen H, Tojo A.	Acute kidney injury after myeloablative cordblood transplantation inadults: the efficacy of strict monitoring of vancomycin serum trough concentrations.	<i>Transplant Infect Dis</i>	15	181-6	2013
Ebihara Y, Takahashi S, Mochizuki S, Kato S, Kawakita T, Ooi J, Yokoyama K, Nagamura F, Tojo A, Asano S, Tsuji K.	Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning regimen in adolescent patients with hematologic malignancies: a single institute analysis.	<i>Leukemia Res</i>	36(2)	128-31	2012