

201438112A

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

**BIM遺伝子多型陽性癌におけるHDAC 阻害薬の耐性克服効果を
最適化する薬力学的効果の指標を探索する研究
(H26-革新的がん-一般-113)**

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 矢野 聖二

平成 27(2015)年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、山崎 光悦が実施した平成26年度「BIM遺伝子多型陽性癌におけるHDAC阻害薬の耐性克服効果を最適化する薬力学的効果の指標を探索する研究」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
BIM多型陽性癌におけるHDAC阻害薬の耐性克服効果を最適化する薬力学的効果の指標を探索する研究	1
矢野聖二	
資料 1 VICTIRY-J/PEOPLE-J/PhD Study合同班会議議事録要旨	
資料 2 PhD Study基礎研究系班会議議事録要旨	
資料 3 PhD Study全体班会議議事録要旨	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. BIM多型陽性癌におけるHDAC阻害薬の耐性克服効果を最適化する薬力学的効果の指標を探索する研究	11
矢野 聖二	
2. BIM多型陽性癌におけるHDAC阻害薬の耐性克服効果を最適化する薬力学的効果の指標を探索する研究	14
藤田 直也	
3. BIM多型陽性癌におけるHDAC阻害薬の耐性克服効果を最適化する薬力学的効果の指標を探索する研究	16
清川 悦子	
4. BIM多型陽性癌におけるHDAC阻害薬の耐性克服効果を最適化する薬力学的効果の指標を探索する研究	18
長谷川 好規	
5. BIM多型陽性癌におけるHDAC阻害薬の耐性克服効果を最適化する薬力学的効果の指標を探索する研究	20
片上 信之	
6. BIM多型陽性癌におけるHDAC阻害薬の耐性克服効果を最適化する薬力学的効果の指標を探索する研究	24
井上 彰	
7. BIM多型陽性癌におけるHDAC阻害薬の耐性克服効果を最適化する薬力学的効果の指標を探索する研究	26
竹内 伸司	
8. BIM多型陽性癌におけるHDAC阻害薬の耐性克服効果を最適化する薬力学的効果の指標を探索する研究	28
安藤 昌彦	
9. BIM多型陽性癌におけるHDAC阻害薬の耐性克服効果を最適化する薬力学的効果の指標を探索する研究	31
清水 忍	
10. BIM多型陽性癌におけるHDAC阻害薬の耐性克服効果を最適化する薬力学的効果の指標を探索する研究	34
藤原 忠美	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	36
IV. 研究成果の刊行物・別刷	42

**BIM多型陽性癌におけるHDAC阻害薬の耐性克服効果を最適化する
薬力学的効果の指標を探索する研究（H26-革新的がん一般-113）**

業務主任者 矢野 聖二 金沢大学がん進展制御研究所 腫瘍内科

研究要旨

本研究は、BIM 遺伝子多型陽性癌の耐性克服における HDAC 阻害薬の至適投与量を決定する薬力学的効果の指標を同定することを目標としている。本年度は、ボリノスタットによる BIM 遺伝子多型陽性 EGFR 変異肺癌細胞株の EGFR-TKI 耐性克服のための薬力学的効果の指標候補として、活性型 BIM 蛋白量と BIM exon 4/exon3 mRNA を取り上げ、それぞれ Western blot 法と real-time RT-PCR 法による測定系を確立した。医師主導治験（VICTORY-J）における検体採取体制および手順を確立した。また、他のがん腫における BIM 遺伝子多型の分子標的薬耐性への関与や新規指標同定に向けた解析に着手した。

A. 研究目的

現在の癌分子標的治療では、殺細胞性抗癌剤と同様に早期臨床試験で決定された推奨量を投与しているが、薬物動態や薬力学的効果には個体差があり、必ずしも最適の薬効が得られていない可能性がある。一方、BIM遺伝子多型は日本人を含む東洋人特異的な多型で、アポトーシス誘導に必須の活性型BIM蛋白質発現が低下する結果アポトーシス抵抗性が惹起され、分子標的薬耐性の原因となる。矢野らは、BIM遺伝子多型を有するEGFR変異肺癌において、リンパ腫で認可されているHDAC阻害薬（ボリノスタット：商品名ゾリンザ）が活性型BIM蛋白質発現を回復させEGFR-TKI耐性を克服することを見出し（Cancer Res 2013）、ボリノスタット+EGFR-TKI併用療法の医師主導治験（第I相試験：VICTORY-J：H25-創薬一般-005）を行っている。さらに、PBMCの活性型BIM発現の測定でHDAC阻害薬の耐性克服活性が評価できる（特願2013-42439）ことから、PBMCの活性型BIMを薬力学的にモニタリングすることで、HDAC阻害薬の薬効を最適化できると推測される。

本研究の目的は、BIM遺伝子多型陽性癌の耐性克服におけるHDAC阻害薬の至適投与量を決定する薬力学的効果の指標を同定することである。

B. 研究方法

① 活性型 BIM 測定系の確立と臨床検体の測定

a. プロジェクトの総合推進

活性型 BIM 測定系の開発状況や医師主導治験（VICTORY-J）における臨床検体の収集状況などを把握し、プロジェクトの円滑な進行を推進する。

（矢野、藤原、清水）

b. 活性型 BIM 測定系の確立

HDAC 阻害薬の薬力学的効果の指標候補分子を特定し、その測定系の確立を目指す。（竹内）

c. 臨床検体の収集

EGFR 変異肺癌における BIM 遺伝子多型測定を行い、BIM 遺伝子多型陽性症例の選択を行う。さらに、BIM 遺伝子多型陽性症例のうち現在進行中の医師主導治験（VICTORY-J）に登録された症例において、末梢血検体の収集を行う。（長谷川、井上、竹内）

d. 臨床検体に付随するデータ管理

EGFR 変異肺癌における BIM 遺伝子多型の有無や、医師主導治験（VICTORY-J）における臨床検体に付随する情報の管理を行う。（安藤）

②他癌種への展開

Driver oncogene（ALK 融合遺伝子、ABL 融合遺伝子、HER 増幅・変異など）を有する他の癌種においても BIM 遺伝子多型が分子標的薬耐性を惹起するかを検討し、EGFR 変異肺癌で得られた知見を他の癌種にも適応可能か否かを明らかにする。（藤田・矢野）。

③HDAC 阻害薬の薬力学的効果の新しい指標の探索

BIM 遺伝子多型を有する EGFR 変異肺癌細胞株を用いたゼノグラフトモデルなどにおいて、HDAC 阻害薬の耐性克服活性のモニタリングに有用な活性型 BIM 以外の新しい指標を探索する。(清川、矢野) (倫理面への配慮)

患者の人権の保護のため、本医師主導治験に関係するすべての研究者は、ヘルシンキ宣言、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、疫学研究に関する倫理指針(平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号)、臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)およびその改正、関連通知を遵守して本研究を実施する。実施にあたり、あらかじめ当該研究機関の長の承認、届出、確認等を研究開始前に手続きする。動物実験を行う場合には、研究実施機関での事前承認を得て、使用する動物の匹数も最小限にとどめて行う。

C. 研究結果

① 活性型 BIM 測定系の確立と臨床検体の測定

a. プロジェクトの総合推進:H26年11月14日に臨床研究系班会議を開催し、適格症例の積極的な治験登録を周知した。さらに、H27年2月27日に全体班会議を開催し、治験の登録候補症例の状態を確認し登録促進の対策を協議するとともに、検体採取方法について再確認した。VICTORY-Jへの登録症例スクリーニングが主目的の臨床疫学研究(BIM多型を有するEGFR変異肺癌の臨床的特徴を明らかにする多施設共同研究:PEOPLE-J)でBIM多型陽性例を32例特定しており、今後病勢進行時にVICTORY-Jに登録し、本研究用の検体保管を進める。うち7例を有する先端医療センター病院をVICTORY-Jの治療施設として追加した。

b. 活性型 BIM 測定系の確立:健常人のPBMCを用いてWestern blot法による活性型BIM蛋白量の測定系、real-time RT-PCR法によるBIM exon 4およびexon3 mRNAの測定系を確立した。in vitroでPBMCにHDAC阻害薬ポリノスタットを添加すると活性型BIM発現が上昇することを見出し、薬力学的効果の指標としての妥当性を確認した。

c. 臨床検体の収集:ポリノスタット+EGFR-TKI併用療法の医師主導治験(VICTORY-J)で、6月17日に名古屋大学で1例目の治療を開始し、治療開始前及び治療2日目のポリノスタット投与4時間後

の末梢血を薬力学的効果解析用に採取した。さらにPBMCを抽出し蛋白・RNA解析用に保管した。

d. 臨床検体に付随するデータ管理

EDCシステムを構築し、EGFR変異肺癌におけるBIM遺伝子多型の有無や、医師主導治験(VICTORY-J)における臨床検体に付随する情報の管理を行った。

②他癌種への展開:既存のALK転座肺癌株のBIM多型解析を実施したが、多型陽性株は検出されなかった。新たにALK転座肺癌15例から15の癌細胞株を樹立し、うち1株がBIM多型をヘテロ接合型で有していることを見出した。BIM多型陽性のALK転座肺癌株は極めて稀少で、これまで報告がない。他癌種への展開をする上で貴重な細胞株が得られたため、平成27年度はALK転座肺癌を重点的に検討する。

③HDAC阻害薬の薬力学的効果の新しい指標探索:新規指標候補として、免疫染色による活性型BIM検出が可能な特異的抗体の作成に取り組み、5つの候補抗体を得た。また、アポトーシス活性(Caspase3/7活性)を生体で検出できるFRETバイオセンサーの作成を完了した。12月25日に基礎研究系班会議を実施し、情報を共有し相互協力する事項を確認した。

D. 考察

ポリノスタットによるBIM遺伝子多型陽性EGFR変異肺癌細胞株のEGFR-TKI耐性克服のための薬力学的効果の指標候補として、活性型BIM蛋白量とBIM exon 4/exon3 mRNAを取り上げ、それぞれWestern blot法とreal-time RT-PCR法による測定系を確立した。実用化に向けては、これらを正確に評価できるより簡便な測定法が必要かもしれない。

E. 結論

ポリノスタットによるBIM遺伝子多型陽性EGFR変異肺癌細胞株のEGFR-TKI耐性克服のための薬力学的効果の指標候補の測定系確立を完了した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ebi H, Oze I, Nakagawa T, Ito H, Hosono S, Matsuda F, Takahashi M, Takeuchi S, Sakao Y, Hida T, Faber AC, Tanaka H, Yatabe Y, Mitsudomi T, Yano S, Matsuo K. Lack of association between the BIM deletion polymorphism and the risk of lung cancer with and without EGFR mutations. **J Thorac Oncol** 2015;10(1):59-66.
 - 2) Li Q, Wang W, Machino Y, Yamada T, Kita K, Oshima M, Sekido Y, Tsuchiya M, Suzuki Y, Nan-Ya K, Iida S, Nakamura K, Iwakiri S, Itoi K, Yano S. Therapeutic activity of glycoengineered anti-GM2 antibodies against malignant pleural mesothelioma. **Cancer Sci** 2014 ;[Epub ahead of print]
 - 3) Ohtsubo K, Yamada T, Zhao L, Jin TF, Takeuchi S, Mouri H, Yamashita K, Yasumoto K, Fujita N, Kitagawa H, Ohta T, Ikeda H, Yano S. Expression of Akt kinase-interacting protein 1, a scaffold protein of the PI3K/PDK1/Akt pathway, in pancreatic cancer. **Pancreas** 2014;43(7):1093-100.
 - 4) Nakade J, Takeuchi S, Nakagawa T, Ishikawa D, Sano T, Nanjo S, Yamada T, Ebi H, Zhao L, Yasumoto K, Matsumoto K, Yonekura K, Yano S. Triple inhibition of EGFR, Met, and VEGF suppresses regrowth of HGF-triggered, erlotinib-resistant lung cancer harboring an EGFR mutation. **J Thorac Oncol** 2014 ; 9(6):775-83.
 - 5) Tanimoto A, Yamada T, Nanjo S, Takeuchi S, Ebi H, Kita K, Matsumoto K, Yano S. Receptor ligand-triggered resistance to alectinib and its circumvention by Hsp90 inhibition in EML4-ALK lung cancer cells. **Oncotarget** 2014 ;15;5(13): 4920-8.
 - 6) Yano S, Nakagawa T. The current state of molecularly targeted drugs targeting HGF/Met. **Jpn J Clin Oncol** 2014 ; 44(1): 9-12.
 - 7) Ebi H, Faber AC, Engelman JA, Yano S. Not just gRASping at flaws: finding vulnerabilities to develop novel therapies for treating KRAS mutant cancers. **Cancer Science** 2014,105(5): 499-505.
 2. 学会発表
 - 1) 矢野聖二. 日本における腫瘍内科教育の今後～分子標的薬体制の克服絵を目指した研究を通して～ 第 111 回日本内科学会講演会. 2014. 04 東京
 - 2) 矢野聖二. 肺がんの分子標的治療薬耐性の機構解明と耐性克服治療開発. 第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会. 2014. 06 仙台.
 - 3) 矢野聖二. 肺がんの骨転移のメカニズムと分子標的治療. 第 23 回日本がん転移学会学術集会・総会. 2014. 07 金沢.
 - 4) 矢野聖二. 脳転移：腫瘍内科の視点から. 第 52 回日本癌治療学会学術集会. 2014. 08 横浜.
 - 5) 矢野聖二. Resistance to EGFR-TKI in EGFR mutant lung cancer. 第 73 回日本癌学会学術総会. 2014.10 横浜
 - 6) Third AACR-IASLC Joint Conference on the Molecular Origins of Lung Cancer. Yano S. Mechanisms of EGFR-TKI resistance in EGFR mutant lung cancer and its therapeutic strategy. 2014 01 San Diego, USA
 - 7) Joint International Symposium on TGF-β Family and Cancer. Yano S. Bone microenvironment confers Hsp90 inhibitor resistance in the metastatic small cell lung cancer. 2014.01 Tsukuba.
 - 8) 15th Annual Targeted Therapies of The Treatment of Lung Cancer. Yano S. Therapeutic activity of glycoengineered anti-GM2 antibody BIW-8962 against malignant pleural mesothelioma. 2015.02. Santa Monica, USA.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
金沢大学から新たに 1 件の国内特許出願を行った。
 2. 実用新案登録
該当なし。
 3. その他
該当なし

資料 1

VICTORY-J/PEOPLE-J/PhD Study 合同班会議

議事録要旨

日 時：2014 年 11 月 14 日（金）19：00～20：10

場 所：国立京都国際会館 2F Room K

出席者：別紙

議事：金沢大 矢野先生の開会挨拶及び参加者自己紹介の後、次のとおり議事が進行された。

1. PEOPLE-J について（名古屋大 安藤先生）

登録の現状報告及び登録のための取り組みについて、次のとおり報告された。

- ・ 本研究は400例登録目標であり、事務局は名大先端医療・臨床研究支援センターである。
- ・ BIM 多型ありの症例を多く集めることが目標。
- ・ 本年3月から研究を開始し順調に推移。18施設で実施しており、191例が登録されている（11月10日時点）。
- ・ このうち、VICTORY-J への潜在的組み入れ候補が16例ある。
- ・ これら候補症例が、他治験に組み入れられないことがないよう近隣医療機関との連携が重要である。例えば、北海道の症例を東北大学に組み入れられるようにしたい。
- ・ 登録状況を随時確認できるようなシステムを構築している。
- ・ 毎月初めに、BIM 多型あり症例の担当医師らにリマインドメールを配信している。

2. VICTORY-J

(1)1 症例目の結果（名古屋大 長谷先生）

名古屋大学での第1症例の経過について、スライドを用いて報告された。また、PEOPLE-J の実施に向けた施設説明会等の取り組みが紹介された。

(2)モニタリングによる留意点（名古屋大 藤原先生）

モニタリングの目的、役割、また、本治験でのモニタリング体制、実施方法、実施状況が報告された。

(3)その他（金沢大 矢野先生）

- ・ 今年度の自己評価報告を提出した。
- ・ 来年2月末を目途に、研究分担報告書の作成をお願いしたい。
- ・ PhD Study では VICTORY-J で得られる臨床検体の一部を用いて実施する予定である。
- ・ 9月17日より CRO が株式会社 CTD に変更になった旨紹介された。

以上

VICTORY-J/PEOPLE-J 班会議

参加者名簿（敬称略）

No	医療機関名	氏名
1	名古屋大学	長谷 哲成
2	名古屋大学	安藤 昌彦
3	名古屋大学	藤原 忠美
4	名古屋大学	清水 忍
5	名古屋大学	安藤 幸子
6	名古屋大学	川影 美千代
7	金沢大学	矢野 聖二
8	金沢大学	竹内 伸司
9	金沢大学	南條 成輝
10	先端医療センター病院	片上 信之
11	先端医療センター病院	藤田 史郎
12	先端医療センター病院	枝川美津穂
13	先端医療センター病院	石原 正美
14	兵庫県立がんセンター	里内 美弥子
15	東北大学	井上 彰
16	東北大学	嶋田 南
17	静岡県立静岡がんセンター	高橋 利明
18	埼玉医科大学国際医療センター	石川 里奈子
19	徳島大学	西岡 安彦
20	福井大学	石塚 全
21	公立陶生病院	木村 智樹
22	JCHO 北海道病院	原田 敏之
23	富山大学	林 龍二
24	LSI メディエンス	脇田 淳
25	LSI メディエンス	石飛 直人
26	LSI メディエンス	大竹 史郎
27	株式会社 CTD	小林 史明
28	株式会社 CTD	森山 麻衣

H26 年度 PhD Study 基礎研究系班会議 議事録要旨

日時：平成 26 年 12 月 25 日（木）12 時 00 分～15 時 00 分

場所：金沢大学医学類（宝町キャンパス）

A 棟 6 階 がん進展制御研究所腫瘍内科カンファレンスルーム

出席者：金沢大学：矢野聖二、竹内伸司、南條成輝、北賢二、福田康二、新井祥子

がん研究会：藤田直也

金沢医科大学：清川悦子

- 1、総括研究代表者 矢野（金沢大）より開会の挨拶があった。引き続き、本研究の目的は、BIM 遺伝子多型陽性癌の耐性克服における HDAC 阻害薬の至適投与量を決定する薬力学的効果の指標を同定することであることが説明された。具体的には、BIM 遺伝子多型を有する EGFR 変異肺癌におけるボリノスタット+EGFR-TKI 併用療法の医師主導治験（第 I 相試験：VICTORY-J：H25-創薬一般-005）で得られる臨床検体を用い、最適の薬力学的効果の指標を同定すること、他癌種における BIM 遺伝子多型の分子標的薬耐性への関与を明らかにすること、新しい薬力学的効果の指標の探索を行うことが説明された。
- 2、活性型 BIM 測定系の確立と医師主導治験の進捗状況について
竹内（金沢大）より、Western blot 法による活性型 BIM 蛋白量の測定系、real-time RT-PCR 法による BIM exon 4 および exon3 mRNA の測定系がほぼ確立されたことが説明された。また、医師主導治験 VICTORY-J において、1 例目の治療開始前及び治療 2 日目のボリノスタット投与 4 時間後の末梢血が薬力学的効果解析用に採取されたことが報告された。
- 3、種々のがん種における BIM 多型と分子標的薬感受性の検討
藤田（がん研究会）より、既存の ALK 転座肺癌株には多型陽性株は検出されなかったこと、新たに ALK 転座肺癌 15 例から 15 の癌細胞株を樹立し、うち 1 株が BIM 多型をヘテロ接合型で有していることを見出したことが報告された。
- 4、HDAC 阻害薬の薬力学的効果の新しい指標の探索
清川（金沢医大）より、アポトーシス活性を生体で検出できる FRET バイオセンサーの作成を完了し、EGFR 変異肺がん細胞株に導入中であることが報告された。
- 5、今後のスケジュールなど
H27 年 2 月 27 日（金）（場所未定）に、全体班会議を予定していることがアナウンスされた。

以上

班會議風景



資料3

革新的がん医療実用化研究事業

BIM 遺伝子多型陽性癌における HDAC 阻害薬の耐性克服効果を 最適化する薬力学的効果の指標を探索する研究 PhD study

－全体班会議議事録要旨－

日時：2015年2月27日（金）15：00～16：30

場所：東京八重洲ホール 411

〒103-0027 東京都中央区日本橋3-4-13 新第一ビル

出席者：別紙

議事：

1、研究代表者 矢野より、挨拶と研究実施体制の概要説明があった。

2、臨床検体収集の進捗状況について

安藤より PEOPLE-J 試験の進捗状況の説明がなされた。2月27日現在で304例の登録があり、32例の BIM 遺伝子多型陽性 EGFR 肺がん症例が検出されており、予定を上回るペースで進行していることが報告された。

また、VICTORY-J 試験の進捗状況として長谷川（名古屋大）、片上（先端医療セ）、井上（東北大）、竹内（金沢大）より発表があり、名古屋大において1例の登録と治療、治療前後の末梢血検体の採取を完了していることが報告された。

3、VICTORY-J 試験、PEOPLE-J 試験についての質疑

VICTORY-J の症例登録を推進するための議論があり、適格基準を満たす BIM 遺伝子多型陽性症例については治験についての説明を適切に行うこと、PEOPLE-J の登録をさらに推進して BIM 遺伝子多型陽性症例を可能な限り多く見つけること、そのために PEOPLE-J の登録数を予定の400例から600例に増加することが提案され、了承された。また、VICTORY-J 実施施設の近隣施設における PEOPLE-J 登録の促進を促すことが提案された。

VICTORY-J 選択基準については、放射線肺臓炎についてはステロイド治療を要した症例を除外することが提案され、了承された。

4、活性型 BIM 測定系の確立と医師主導治験の進捗状況について

竹内（金沢大）より、Western blot 法による活性型 BIM 蛋白量の測定系、real-time

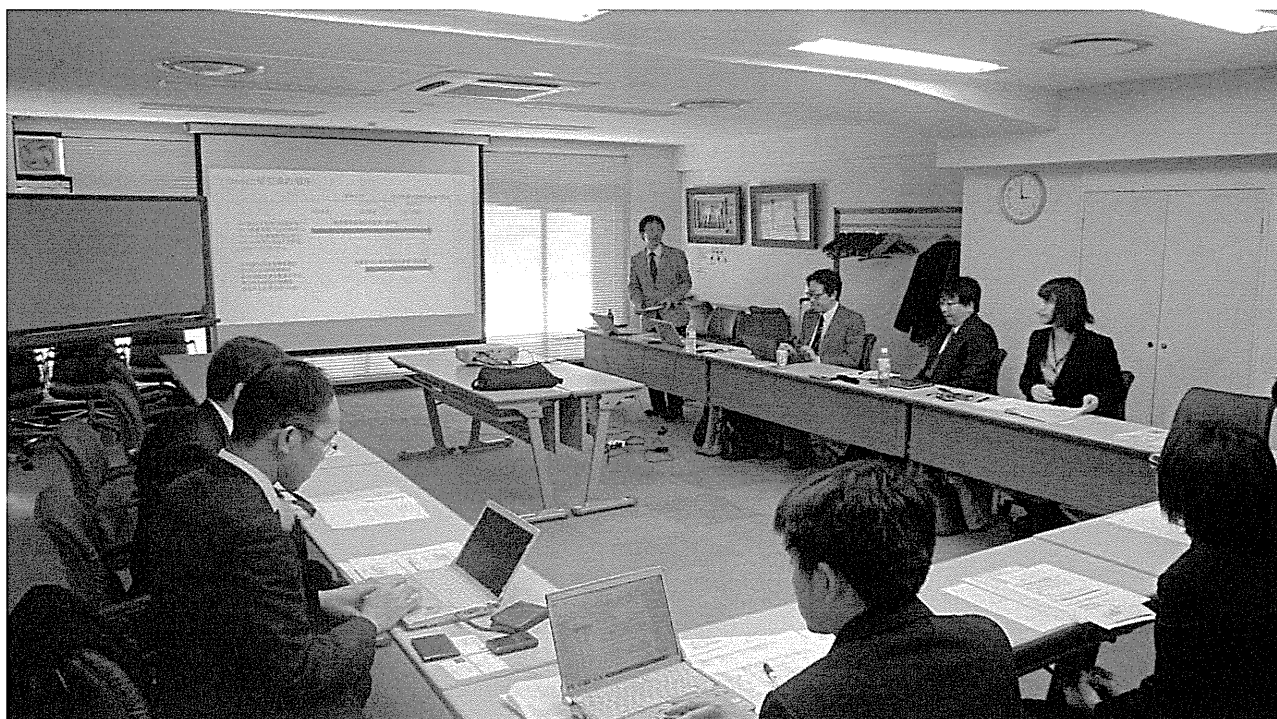
RT-PCR 法による BIM exon 4 および exon3 mRNA の測定系がほぼ確立されたことが説明された。また、医師主導治験 VICTORY-J において、1 例目の治療開始前及び治療 2 日目のボリノスタット投与 4 時間後の末梢血が薬力学的効果解析用に採取されたことが報告された。

5、種々のがん種における BIM 多型と分子標的薬感受性の検討

藤田（がん研究会）より、既存の ALK 転座肺癌株の BIM 多型解析を実施したが、多型陽性株は検出されなかったこと、新たに ALK 転座肺癌 15 例から 15 の癌細胞株を樹立し、うち 1 株が BIM 多型をヘテロ接合型で有していることを見出したことが報告された。

6、矢野（金沢大）より、今後の報告書作成および H27 年度のスケジュールなどについて説明があった。

班会議風景



革新的がん医療実用化研究事業
BIM 遺伝子多型陽性がんにおける HDAC 阻害薬の耐性克服効果を
最適化する薬力学的効果の指標を探索する研究
PhD study 班会議：2015年2月27日（金）

出席者名簿（敬称略）

No	医療機関名	氏名
1	名古屋大学	長谷川 好規
2	名古屋大学	近藤 征史
3	名古屋大学	長谷 哲成
4	名古屋大学	安藤 昌彦
5	名古屋大学	清水 忍
6	名古屋大学	太田 有美
7	先端医療センター	片上 信之
8	金沢大学	矢野 聖二
9	金沢大学	竹内 伸司
10	東北大学	井上 彰
11	東北大学	宮内 栄作
12	がん研究会がん研究所	藤田 直也
13	金沢医科大学	清川 悦子

BIM多型陽性癌におけるHDAC阻害薬の耐性克服効果を最適化する薬力学的効果の指標を探索する研究（H26-革新的がん一般-113）

担当責任者 矢野 聖二 金沢大学がん進展制御研究所 腫瘍内科

研究要旨

本研究は、BIM 遺伝子多型陽性癌の耐性克服における HDAC 阻害薬の至適投与量を決定する薬力学的効果の指標を同定することを目標としている。本年度は、ボリノスタットによる BIM 遺伝子多型陽性 EGFR 変異肺癌細胞株の EGFR-TKI 耐性克服のための薬力学的効果の指標候補として、活性型 BIM 蛋白量と BIM exon 4/exon3 mRNA を取り上げ、それぞれ Western blot 法と real-time RT-PCR 法による測定系を確立した。医師主導治験（VICTORY-J）における検体採取体制および手順を確立した。また、他のがん腫における BIM 遺伝子多型の分子標的薬耐性への関与や新規指標同定に向けた解析に着手した。

A. 研究目的

現在の癌分子標的治療では、殺細胞性抗癌剤と同様に早期臨床試験で決定された推奨量を投与しているが、薬物動態や薬力学的効果には個体差があり、必ずしも最適の薬効が得られていない可能性がある。一方、BIM遺伝子多型は日本人を含む東洋人特異的な多型で、アポトーシス誘導に必須の活性型BIM蛋白質発現が低下する結果アポトーシス抵抗性が惹起され、分子標的薬耐性の原因となる。矢野らは、BIM遺伝子多型を有するEGFR変異肺癌において、リンパ腫で認可されているHDAC阻害薬（ボリノスタット：商品名ゾリンザ）が活性型BIM蛋白質発現を回復させEGFR-TKI耐性を克服することを見出し（Cancer Res 2013）、ボリノスタット+EGFR-TKI併用療法の医師主導治験（第I相試験：VICTORY-J：H25-創薬一般-005）を行っている。さらに、PBMCの活性型BIM発現の測定でHDAC阻害薬の耐性克服活性が評価できる（特願2013-42439）ことから、PBMCの活性型BIMを薬力学的にモニタリングすることで、HDAC阻害薬の薬効を最適化できると推測される。

本研究の目的は、BIM遺伝子多型陽性癌の耐性克服におけるHDAC阻害薬の至適投与量を決定する薬力学的効果の指標を同定することである。

B. 研究方法

① 活性型 BIM 測定系の確立と臨床検体の測定

a. プロジェクトの総合推進

活性型 BIM 測定系の開発状況や医師主導治験（VICTORY-J）における臨床検体の収集状況などを把握し、プロジェクトの円滑な進行を推進する。

② HDAC 阻害薬の薬力学的効果の新しい指標の探索

BIM 遺伝子多型を有する EGFR 変異肺癌細胞株を用いたゼノグラフトモデルなどにおいて、HDAC 阻害薬の耐性克服活性のモニタリングに有用な活性型 BIM 以外の新しい指標を探索する。

（倫理面への配慮）

患者の人権の保護のため、本医師主導治験に関係するすべての研究者は、ヘルシンキ宣言、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）、疫学研究に関する倫理指針（平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号）、臨床研究に関する倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）およびその改正、関連通知を遵守して本研究を実施する。実施にあたり、あらかじめ当該研究機関の長の承認、届出、確認等を研究開始前に手続きする。動物実験を行う場合には、研究実施機関での事前承認を得て、使用する動物の匹数も最小限にとどめて行う。

C. 研究結果

① 活性型 BIM 測定系の確立と臨床検体の測定

a. プロジェクトの総合推進: H26 年 11 月 14 日に臨床研究系班会議を開催し、適格症例の積極的な治験登録を周知した。さらに、H27 年 2 月 27 日に全体班会議を開催し、治験の登録候補症例の状態を確認し登録促進の対策を協議するとともに、検体採取方法について再確認した。VICTORY-J への登録症例スクリーニングが主目的の臨床疫学研究 (BIM 多型を有する EGFR 変異肺がんの臨床的特徴を明らかにする多施設共同研究: PEOPLE-J) で BIM 多型陽性例を 32 例特定しており、今後病勢進行時に VICTORY-J に登録し、本研究用の検体保管を進める。うち 7 例を有する先端医療センター病院を VICTORY-J の治療施設として追加した。

② HDAC 阻害薬の薬力学的効果の新しい指標探索: 新規指標候補として、免疫染色による活性型 BIM 検出が可能な特異的抗体の作成に取り組み、5 つの候補抗体を得た。また、アポトーシス活性

(Caspase3/7 活性) を生体で検出できる FRET バイオセンサーの作成を完了した。12 月 25 日に基礎研究系班会議を実施し、基礎実験系プロジェクトについて情報を共有し相互協力する事項を確認した。

D. 考察

ポリノスタットによる BIM 遺伝子多型陽性 EGFR 変異肺がん細胞株の EGFR-TKI 耐性克服のための薬力学的効果の指標候補として、活性型 BIM 蛋白量と BIM exon 4/exon3 mRNA を取り上げ、それぞれ Western blot 法と real-time RT-PCR 法による測定系を確立した。実用化に向けては、これらを正確に評価できるより簡便な測定法が必要かもしれない。

E. 結論

ポリノスタットによる BIM 遺伝子多型陽性 EGFR 変異肺がん細胞株の EGFR-TKI 耐性克服のための薬力学的効果の指標候補の測定系確立を完了した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Ebi H, Oze I, Nakagawa T, Ito H, Hosono S, Matsuda F, Takahashi M, Takeuchi S, Sakao Y, Hida T, Faber AC, Tanaka H, Yatabe Y, Mitsudomi T, Yano S, Matsuo K. Lack of association between the BIM deletion polymorphism and the risk of lung cancer

with and without EGFR mutations. **J Thorac Oncol** 2015;10(1):59-66.

- 2) Li Q, Wang W, Machino Y, Yamada T, Kita K, Oshima M, Sekido Y, Tsuchiya M, Suzuki Y, Nan-Ya K, Iida S, Nakamura K, Iwakiri S, Itoi K, Yano S. Therapeutic activity of glycoengineered anti-GM2 antibodies against malignant pleural mesothelioma. **Cancer Sci** 2014 ;[Epub ahead of print]
- 3) Ohtsubo K, Yamada T, Zhao L, Jin TF, Takeuchi S, Mouri H, Yamashita K, Yasumoto K, Fujita N, Kitagawa H, Ohta T, Ikeda H, Yano S. Expression of Akt kinase-interacting protein 1, a scaffold protein of the PI3K/PDK1/Akt pathway, in pancreatic cancer. **Pancreas** 2014;43(7):1093-100.
- 4) Nakade J, Takeuchi S, Nakagawa T, Ishikawa D, Sano T, Nanjo S, Yamada T, Ebi H, Zhao L, Yasumoto K, Matsumoto K, Yonekura K, Yano S. Triple inhibition of EGFR, Met, and VEGF suppresses regrowth of HGF-triggered, erlotinib-resistant lung cancer harboring an EGFR mutation. **J Thorac Oncol** 2014 ; 9(6):775-83.
- 5) Tanimoto A, Yamada T, Nanjo S, Takeuchi S, Ebi H, Kita K, Matsumoto K, Yano S. Receptor ligand-triggered resistance to alectinib and its circumvention by Hsp90 inhibition in EML4-ALK lung cancer cells. **Oncotarget** 2014 ;15;5(13): 4920-8.
- 6) Yano S, Nakagawa T. The current state of molecularly targeted drugs targeting HGF/Met. **Jpn J Clin Oncol** 2014 ; 44(1): 9-12.
- 7) Ebi H, Faber AC, Engelman JA, Yano S. Not just gRASping at flaws: finding vulnerabilities to develop novel therapies for treating KRAS mutant cancers. **Cancer Science** 2014,105(5): 499-505.

2. 学会発表

- 1) 矢野聖二. 日本における腫瘍内科教育の今後～分子標的薬体制の克服絵を目指した研究を通して～ 第 111 回日本内科学会講演会. 2014. 04 東京
- 2) 矢野聖二. 肺がんの分子標的治療薬耐性の機構解明と耐性克服治療開発. 第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会. 2014. 06 仙台.

- 3) 矢野聖二. 肺がんの骨転移のメカニズムと分子標的治療. 第23回日本がん転移学会学術集会・総会. 2014.07 金沢
- 4) 矢野聖二. 脳転移: 腫瘍内科の視点から. 第52回日本癌治療学会学術集会. 2014.08 横浜
- 5) 矢野聖二. Resistance to EGFR-TKI in EGFR mutant lung cancer. 第73回日本癌学会学術総会. 2014.10 横浜
- 6) Third AACR-IASLC Joint Conference on the Molecular Origins of Lung Cancer. Yano S. Mechanisms of EGFR-TKI resistance in EGFR mutant lung cancer and its therapeutic strategy. 2014年1月 San Diego, USA
- 7) Joint International Symposium on TGF- β Family and Cancer. Yano S. Bone microenvironment confers Hsp90 inhibitor resistance in the metastatic small cell lung cancer. 2014.01 Tsukuba, Japan
- 8) 15th Annual Targeted Therapies of The Treatment of Lung Cancer. Yano S. Therapeutic activity of glycoengineered anti-GM2 antibody BIW-8962 against malignant pleural mesothelioma. 2015.02. Santa Monica, USA.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

金沢大学から新たに1件の国内特許出願を行った。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

**BIM多型陽性癌におけるHDAC阻害薬の耐性克服効果を最適化する
薬力学的効果の指標を探索する研究（H26-革新的がん一般-113）**

担当責任者：藤田 直也 所属：がん研究会 がん化学療法センター

研究要旨

本研究は、BIM 遺伝子多型陽性癌の耐性克服における HDAC 阻害薬の至適投与量を決定する薬力学的効果の指標を同定することを目標としている。本年度は、Driver oncogene（ALK 融合遺伝子、ABL 融合遺伝子、HER 増幅・変異など）を有する他の癌種においても BIM 遺伝子多型が分子標的薬耐性を惹起するかを検討するために、肺癌患者から独自の手法で樹立することに成功している ALK 融合遺伝子陽性癌細胞株をスクリーニングし、BIM 遺伝子多型陽性細胞株の同定に成功した。これにより、EGFR 変異肺癌以外の癌種での検討を行う材料が整備されたと言える。

A. 研究目的

現在の癌分子標的治療では、殺細胞性抗癌剤と同様に早期臨床試験で決定された推奨量を投与しているが、薬物動態や薬力学的効果には個体差があり、必ずしも最適の薬効が得られていない可能性がある。一方、BIM遺伝子多型は日本人を含む東洋人特異的な多型で、アポトーシス誘導に必須の活性型BIM蛋白質発現が低下する結果アポトーシス抵抗性が惹起され、分子標的薬耐性の原因となる。矢野らは、BIM遺伝子多型を有するEGFR変異肺癌において、リンパ腫で認可されているHDAC阻害薬（ポリノスタット：商品名ゾリンザ）が活性型BIM蛋白質発現を回復させEGFR-TKI耐性を克服することを見出し（Cancer Res 2013）、ポリノスタット+EGFR-TKI併用療法の医師主導治験（第I相試験：VICTORY-J：H25-創薬一般-005）を行っている。さらに、PBMCの活性型BIM発現の測定でHDAC阻害薬の耐性克服活性が評価できる（特願2013-42439）ことから、PBMCの活性型BIMを薬力学的にモニタリングすることで、HDAC阻害薬の薬効を最適化できると推測される。

本研究の目的は、BIM遺伝子多型陽性癌の耐性克服におけるHDAC阻害薬の至適投与量を決定する薬力学的効果の指標を同定することである。藤田は、他癌種においてもBIM遺伝子多型が分子標的薬耐性に関与するのか、耐性に関与する場合HDAC阻害薬により耐性が解除できるか否かについて研究を担当する。

B. 研究方法

①他癌種への展開

Driver oncogene（ALK 融合遺伝子、ABL 融合遺伝子、HER 増幅・変異など）を有する他の癌種においても BIM 遺伝子多型が分子標的薬耐性を惹起するかを検討し、EGFR 変異肺癌で得られた知見を他の癌種にも適応可能か否かを明らかにする。

（倫理面への配慮）

患者の人権の保護のため、本医師主導治験に関係するすべての研究者は、ヘルシンキ宣言、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）、疫学研究に関する倫理指針（平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号）、臨床研究に関する倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）およびその改正、関連通知を遵守して本研究を実施する。実施にあたり、あらかじめ当該研究機関の長の承認、届出、確認等を研究開始前に手続きする。動物実験を行う場合には、研究実施機関での事前承認を得て、使用する動物の匹数も最小限にとどめて行う。

C. 研究結果

他癌種への展開： 公的細胞バンクなどから ALK 融合遺伝子陽性肺癌株を入手し、これら細胞株の BIM 多型解析を実施した。しかし残念なことに、BIM 多型陽性株は検出されなかった。そこで、研究分担者の藤田が所属するがん研究会の臨床研究倫理審査委員会の許可のもと、検体取得の際の被験者に

対するインフォームドコンセントを書面で行ったうえで ALK 融合遺伝子陽性肺癌 15 症例分の組織を取得し、その組織から肺腺癌細胞株を 15 株樹立した。樹立できた細胞株の BIM 多型解析を行った結果、1 株が BIM 多型をヘテロ接合型で有していることを見出した。BIM 多型陽性の ALK 融合遺伝子陽性肺腺癌株は極めて稀少であり、これまで報告がない。他癌種への展開をする上で貴重な細胞株が得られた。H27 年度は、樹立継続中の肺癌細胞株や大腸癌細胞株などにおける BIM 多型解析も行う。BIM 多型が確認された陽性細胞株を用い、分子標的薬剤耐性への関与と、HDAC 阻害薬による耐性解除の可能性を検討する。

H26 年 12 月 25 日に基礎研究系班会議を実施し、情報を共有し相互協力する事項を確認した。

D&E. 考察および結論

ALK 融合遺伝子陽性肺癌患者から樹立することに成功した癌細胞株の BIM 多型解析を行い、BIM 多型陽性の細胞株の同定に成功した。これにより、EGFR 変異肺癌以外の癌種での検討を行う材料が整備されたと言える。また、BIM 遺伝子多型が分子標的薬剤耐性を惹起する可能性をより広い癌種で確認するために、現在進めている臨床検体由来の肺扁平上皮癌細胞株や大腸癌細胞株などにおける BIM 多型解析と HDAC 阻害薬による耐性解除の可能性の検討をさらに進めることが必要と考えられた。

F. 研究発表

- 論文発表
 - Katayama R, Kobayashi Y, Friboulet L, Lockerman EL, Koike S, Shaw AT, Engelman JA, Fujita N. Cabozantinib overcomes crizotinib resistance in ROS1 fusion-positive cancer. **Clin Cancer Res**, 2015; 21: 166-74.
 - Aoyama A, Katayama R, Oh-Hara T, Sato S, Okuno Y, Fujita N. Tivantinib (ARQ 197) exhibits antitumor activity by directly interacting with tubulin and overcomes ABC transporter-mediated drug resistance. **Mol Cancer Ther**, 2014; 13: 2978-90.
 - Katayama R, Friboulet L, Koike S, Lockerman EL, Khan TM, Gainor JF, Iafrate AJ, Takeuchi K, Taiji M, Okuno Y, Fujita N, Engelman JA, Shaw AT. Two novel ALK mutations mediate acquired resistance to the next-generation ALK inhibitor alectinib. **Clin Cancer Res**, 2014; 20: 5686-96.
- 学会発表
 - 藤田直也. ALK 阻害薬への耐性とその克服. 日本癌学会シンポジウム/共同利用・共同研究拠点シンポジウム. 2015.01. 金沢.
 - 片山量平, 藤田直也. Acquired resistance in ALK rearranged NSCLC: Mechanisms of and strategies to overcome resistance. 第 73 回日本癌学会総会. 2014.09. 横浜.
 - 坂下卓矢, 片山量平, 藤田直也. New resistance mechanisms to second-generation ALK inhibitor Ceritinib (LDK378). 第 73 回日本癌学会総会. 2014.09. 横浜.
 - 小池清恵, 片山量平, 藤田直也. Identification of the alectinib-resistance mechanism in NSCLC harboring ALK rearrangement. 第 73 回日本癌学会総会. 2014.09. 横浜.
 - 小林由佳, 片山量平, 藤田直也. Identification of and overcoming the crizotinib and ceritinib resistance in ROS1-rearranged lung cancers. 第 73 回日本癌学会総会. 2014.09. 横浜.
 - 青山暁, 片山量平, 藤田直也. Tivantinib (ARQ197) shows antitumor activity by reduced tubulin polymerization and overcomes tubulin binder-resistance. 第 73 回日本癌学会総会. 2014.09. 横浜.

- Takagi S, Takemoto A, Takami M, Oh-Hara T, Fujita N. Platelets promote osteosarcoma cell growth through activation of the platelet-derived growth factor receptor-Akt signaling axis. **Cancer Sci**, 2014; 105: 983-8.
- Friboulet L, Li N, Katayama R, Lee CC, Gainor JF, Crystal AS, Michellys PY, Awad MM, Yanagitani N, Kim S, Pferdekammer AC, Li J, Kasibhatla S, Sun F, Sun X, Hua S, McNamara P, Mahmood S, Lockerman EL, Fujita N, Nishio M, Harris JL, Shaw AT, Engelman JA. The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. **Cancer Discov**, 2014; 4: 662-73.

2. 学会発表

- 藤田直也. ALK 阻害薬への耐性とその克服. 日本癌学会シンポジウム/共同利用・共同研究拠点シンポジウム. 2015.01. 金沢.
- 片山量平, 藤田直也. Acquired resistance in ALK rearranged NSCLC: Mechanisms of and strategies to overcome resistance. 第 73 回日本癌学会総会. 2014.09. 横浜.
- 坂下卓矢, 片山量平, 藤田直也. New resistance mechanisms to second-generation ALK inhibitor Ceritinib (LDK378). 第 73 回日本癌学会総会. 2014.09. 横浜.
- 小池清恵, 片山量平, 藤田直也. Identification of the alectinib-resistance mechanism in NSCLC harboring ALK rearrangement. 第 73 回日本癌学会総会. 2014.09. 横浜.
- 小林由佳, 片山量平, 藤田直也. Identification of and overcoming the crizotinib and ceritinib resistance in ROS1-rearranged lung cancers. 第 73 回日本癌学会総会. 2014.09. 横浜.
- 青山暁, 片山量平, 藤田直也. Tivantinib (ARQ197) shows antitumor activity by reduced tubulin polymerization and overcomes tubulin binder-resistance. 第 73 回日本癌学会総会. 2014.09. 横浜.

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 特許取得
該当なし。
- 実用新案登録
該当なし。
- その他
該当なし。

**BIM多型陽性癌におけるHDAC阻害薬の耐性克服効果を最適化する
薬力学的効果の指標を探索する研究（H26-革新的がん一般-113）**

担当責任者 清川 悦子 所属 金沢医科大学 病理学 I

研究要旨

本研究は、BIM 遺伝子多型陽性癌の耐性克服における HDAC 阻害薬の至適投与量を決定する薬力学的効果の指標を同定することを目標としている。本年度は、Driver oncogene（ALK 融合遺伝子、ABL 融合遺伝子、HER 増幅・変異など）を有する他の癌種においても BIM 遺伝子多型が分子標的薬耐性を惹起するかを検討するために、独自に ALK 肺がん患者から樹立したがん細胞株のなかから、BIM 遺伝子多型陽性細胞株を見出した。これにより、EGFR 変異肺がん以外のがん種での検討を行う材料が整備されたと言える。

A. 研究目的

現在の癌分子標的治療では、殺細胞性抗癌剤と同様に早期臨床試験で決定された推奨量を投与しているが、薬物動態や薬力学的効果には個体差があり、必ずしも最適の薬効が得られていない可能性がある。一方、BIM遺伝子多型は日本人を含む東洋人特異的な多型で、アポトーシス誘導に必須の活性型BIM蛋白質発現が低下する結果アポトーシス抵抗性が惹起され、分子標的薬耐性の原因となる。矢野らは、BIM遺伝子多型を有するEGFR変異肺癌において、リンパ腫で認可されているHDAC阻害薬（ボリノスタット：商品名ゾリンザ）が活性型BIM蛋白質発現を回復させEGFR-TKI耐性を克服することを見出し(Cancer Res 2013)、ボリノスタット+EGFR-TKI併用療法の医師主導治験（第I相試験：VICTORY-J：H25-創薬一般-005）を行っている。さらに、PBMCの活性型BIM発現の測定でHDAC阻害薬の耐性克服活性が評価できる（特願2013-42439）ことから、PBMCの活性型BIMを薬力学的にモニタリングすることで、HDAC阻害薬の薬効を最適化できると推測される。

本研究の目的は、BIM遺伝子多型陽性癌の耐性克服におけるHDAC阻害薬の至適投与量を決定する薬力学的効果の指標を同定することである。清川は、HDAC阻害薬の薬力学的効果の新しい指標探索を分担する。

B. 研究方法

①HDAC 阻害薬の薬力学的効果の新しい指標の探索
BIM 遺伝子多型を有する EGFR 変異肺癌細胞株を用いたゼノグラフトモデルなどにおいて、HDAC 阻害薬の耐性克服活性のモニタリングに有用な活性型 BIM 以外の新しい指標を探索する。

（倫理面への配慮）

患者の人権の保護のため、本医師主導治験に関係するすべての研究者は、ヘルシンキ宣言、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）、疫学研究に関する倫理指針（平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号）、臨床研究に関する倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）およびその改正、関連通知を遵守して本研究を実施する。実施にあたり、あらかじめ当該研究機関の長の承認、届出、確認等を研究開始前に手続きする。

C. 研究結果

HDAC阻害薬の薬力学的効果の新しい指標探索：新規指標候補として、アポトーシス誘導酵素活性に着目し、Caspase3/7活性を生体で検出できるFRETバイオセンサーを発現する細胞株を樹立し、免疫不全マウスに移植する系を確立した。また2光子顕微鏡下での観察方法も検討し、スキンフラップ法が最良であることを確認した。12月25日に基礎研究系班会議を実施し、情報を共有し相互協力する事項を確認した。

D. 考察

本研究において、ヒト由来の BIM 多型を有する肺癌細胞に初めて FRET バイオセンサーを発現させることが出来た。細胞株によって FRET バイオセンサーの発現量の多寡があることがわかった。このことは、今後様々な細胞株において、2 光子顕微鏡で観察できる検出感度が異なることを示しており、今後用いることになる細胞株毎の発現量を確認する必要があることを示している。

E. 結論

HDAC 阻害薬の薬力学的効果の新規指標候補として、アポトーシス誘導酵素活性に着目し、Caspase3/7 活性を生体で検出できる FRET バイオセンサーを発現する細胞株を樹立し、免疫不全マウスに移植する系を確立した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

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。