

新たなパラダイムに基づく悪性腫瘍の 個別化診断・治療法の研究基盤構築

平成 24 年度～平成 28 年度
『私立大学戦略的研究基盤形成支援事業』

研究成果報告書

平成 29 年 3 月

学校法人名 : 学校法人 昭和大学

大学名 : 昭和大学

研究組織名 : 腫瘍分子生物学研究所

研究代表者 : 片桐 敬

(名誉学長)

昭和大学 戦略的研究基盤形成事業終了にあたって

腫瘍分子生物学研究所を中心とした昭和大学のハイテクリサーチセンター整備事業として、平成9年度から平成13年度「細胞増殖・分化制御の分子メカニズムに基づくがんの診断と治療法の開発」（代表者：黒木 登志夫教授）、平成14年度から平成18年度「シグナル伝達とゲノム解析による三大疾患（がん、心疾患、脳卒中）の病因解析と治療法開発」（代表者：野瀬 清教授）、平成19年度より平成23年度戦略的研究基盤形成事業「悪性腫瘍の分子的理解に基づく個別化診断・治療法の基盤構築」（代表者：片桐 敬）の課題で、医学部、歯学部、薬学部に属する複数の研究者が参加して活発に研究を行ってきた。これらの研究基盤の上に、平成24年度より平成28年度の5ヶ年に渡り、今回の戦略的研究基盤形成事業「新たなパラダイムに基づく悪性腫瘍の個別化診断・治療法の研究基盤構築」をテーマに研究を続けてきた。

研究は次の3本のプロジェクトに従って進められ、腫瘍分子生物学研究所をはじめ本学の代表的な研究者が参加した。

- (1) 新たなパラダイムに基づく新規癌標的分子の探索
- (2) がん個別化学療法を目指した抗がん剤感受性、耐性の分子機構の解析
- (3) 個別化診断・有害事象予測におけるバイオマーカーの開発

本邦においてがんが死亡原因の1位を占めるようになって久しいが、その治療法は分子標的治療薬の登場により近年長足の進歩を遂げ、化学療法による長期生存例も認められるようになってきている。本事業の研究期間は、標準的ながんの治療法として認知された分子標的治療の選択肢が飛躍的に増え、更にごん医療のひとつの転換点と考えられる免疫チェックポイント阻害剤が驚くべき成果を上げてきた時期と一致する。本研究に携わった臨床系、基礎系の研究者にとっては、これらの成果を目の当たりにしながら研究を推進することができ、非常に時宜を得たテーマであったと思われる。本報告書に見るように、本事業においてはがんの細胞生物学的な特性について様々な方向から分子機構を解析し、個別化治療に向けた新規分子標的、腫瘍マーカーの開発について5年間に相当の研究成果を上げることができた。これらの成果を臨床につなげるためには多くの課題が残されているが、今回の研究組織をもとに、医療系総合大学としての本学の特性を生かした研究連携をさらに充実させ、これらの研究が発展することに期待したい。

「昭和大学 戦略的研究基盤形成事業」の終了にあたり、このような機会を与えていただいた文部科学省私学事業団ならびに学校法人昭和大学 小口 勝司理事長に改めて感謝の意を表すものである。

平成29年3月

昭和大学 戦略的研究基盤形成事業 代表

片桐 敬 (名誉学長)

平成 24 年度～平成 28 年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」
研究成果報告書概要

- 1 学校法人名 昭和大学 2 大学名 昭和大学
- 3 研究組織名 腫瘍分子生物学研究所
- 4 プロジェクト所在地 東京都品川区旗の台 1-5-8
- 5 研究プロジェクト名 新たなパラダイムに基づく悪性腫瘍の個別化診断・治療法の
研究基盤構築
- 6 研究観点 研究拠点を形成する研究
- 7 研究代表者
- | 研究代表者名 | 所属部局名 | 職名 |
|--------|-------|------|
| 片桐 敬 | | 名誉学長 |
- 8 プロジェクト参加研究者数 7 名
- 9 該当審査区分 理工・情報 生物・医歯 人文・社会

研究プロジェクトに参加する主な研究者

10 研究プロジェクトに参加する主な研究者

研究者名	所属・職名	プロジェクトでの研究課題	プロジェクトでの役割
柴沼質子	腫瘍分子生物学研究所・教授 (兼担、薬学部・腫瘍分子細胞学教室)	1. 新たなパラダイムに基づく新規癌標的分子の探索 ミトコンドリア呼吸不全を基礎とする細胞悪性化形質誘導機構の解明と臨床応用の可能性	ミトコンドリア呼吸鎖の遺伝子における突然変異の探索と、がん悪性度との関連
宮崎 章	医学部・生化学教室・教授	細胞接着斑分子を標的としたがん治療戦略の構築	がん組織間質におけるHic5の発現と、がん発生に対する生理活性の分子機構解析
大森 亨	腫瘍分子生物学研究所・准教授(兼担、医学部・内科学・呼吸器・アレルギー内科学分野)	2. がん個別化学療法を目指した抗がん剤感受性、耐性の分子機構の解析 ヒト上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)の耐性機構およびその克服法の開発	非小細胞肺癌の抗がん剤耐性・転移の分子機構解析と耐性克服法の開発
中村清吾	医学部・外科学・乳腺外科分野・教授	乳がんの個別化医療を目指して 一特に治療抵抗性乳がんの分子的理解一	Triple negative 乳がんとBRCA 蛋白質の関連性に関する解析と薬剤耐性因子の探索
佐々木康綱	医学部・内科学・腫瘍内科学分野・教授(兼担、腫瘍分子生物学研究所・所長代行)	3. 個別化診断・有害事象予測におけるバイオマーカーの開発 非小細胞肺癌患者に対するEGFR-TKI エルロチニブおよびゲフィチニブによる間質性肺炎と薬物動態	EGFR-TKI 誘導間質性肺炎と薬物動態・薬物輸送担体 ABCG2 遺伝子多型解析
代田 達夫	歯学部・口腔外科学・	口腔がんにおけるメチル化遺伝子、miRNA を用いた	口腔がん組織メチル化遺伝子、miRNA の網羅

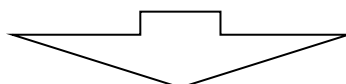
	顎顔面口腔外科学部門・教授	腫瘍マーカーによる早期診断法の開発	的解析
大滝博和	医学部・解剖学・顕微解剖学・講師	培養ヒトグリオーマ細胞における PACAP および PACAP 受容体の発現と幹細胞マーカーとの相関性	グリオーマ細胞における PACAP、PACAP 受容体発現と機能解析
(共同研究機関等)			

<研究者の変更状況（研究代表者を含む）>

旧

プロジェクトでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
	学長（研究所長代行）	片桐 敬	研究代表者・研究の統括

（変更の時期：平成 25 年 7 月 28 日 退職による所属・職名の変更）



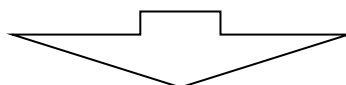
新

変更前の所属・職名	変更（就任）後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
学長（研究所長代行）	名誉学長	片桐 敬	研究代表者・研究の統括

旧

プロジェクトでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
口腔がんにおけるメチル化遺伝子、miRNA を用いた腫瘍マーカーによる早期診断法の開発	口控制御外科学・教授	新谷 悟	口腔がん組織メチル化遺伝子、miRNA の網羅的解析

（変更の時期：平成 25 年 12 月 31 日 退職による変更）



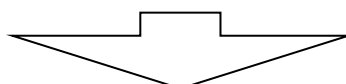
新

変更前の所属・職名	変更（就任）後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
	歯学部・口腔外科学・顎顔面外科学部門・教授	代田 達夫	口腔がん組織メチル化遺伝子、miRNA の網羅的解析

旧

プロジェクトでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
培養ヒトグリオーマ細胞における PACAP および PACAP 受容体の発現と幹細胞マーカー尾の相関性	腫瘍分子生物学研究所・教授（兼担、医学部・第一解剖学）	塩田清二	グリオーマ細胞における PACAP、PACAP 受容体発現と機能解析

（変更の時期：平成 27 年 3 月 31 日 退職による変更）



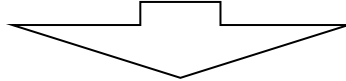
新

変更前の所属・職名	変更（就任）後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
	医学部・解剖学講座・顕微解剖学・講師	大滝博和	グリオーマ細胞における PACAP、PACAP 受容体発現と機能解析

旧

プロジェクトでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
Met 増幅 EGFR-TKI 獲得耐性における 2 次治療としての新規治療戦略の確立	医学部・内科学講座・呼吸器アレルギー内科学部門	廣瀬 敬	新規 EGFR 阻害剤耐性機構の解析と耐性克服法の開発

(変更の時期：平成 24 年 7 月 1 日 診療体制の改変により変更)



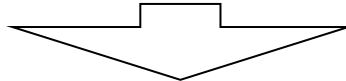
新

変更前の所属・職名	変更（就任）後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
	医学部・内科学・腫瘍内科学分野・教授（兼担、腫瘍分子生物学研究所・所長代行）	佐々木康綱	EGFR-TKI 誘導間質性肺炎と薬物動態・薬物輸送担体 ABCG2 遺伝子多型解析

旧

プロジェクトでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
	消化器内科学教室・講師	小西和夫	DNA メチル化解析を用いた大腸発癌過程の解明

(変更の時期：平成 24 年 7 月 1 日 診療体制の改変により変更)



新

変更前の所属・職名	変更（就任）後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
	医学部・内科学・腫瘍内科学分野・教授（兼担、腫瘍分子生物学研究所・所長代行）	佐々木康綱	EGFR-TKI 誘導間質性肺炎と薬物動態・薬物輸送担体 ABCG2 遺伝子多型解析

研究成果報告書概要

ミトコンドリア呼吸鎖不全を基盤とする細胞悪性化形質誘導機構の解明と
臨床応用の可能性

薬学部 生体分子薬学講座 腫瘍細胞生物学部門 柴沼 質子

【概要】

殆どのヒトがん細胞でミトコンドリア DNA (mtDNA) に変異が見つかる。これは、mtDNA が核 DNA に比べて変異原に対して脆弱であるためとされ、様々な変異原存在下でミトコンドリアは容易に DNA に傷害を受けて機能障害に陥る。私たちは、DNA 傷害を生じるような酸化ストレス下に細胞において、実際、ミトコンドリアの機能（呼吸鎖）が低下することを観察した（業績 *Free Radical Res.* 45: 672-680 (2011)）。

変異部位については、mtDNA の転写と複製の制御領域である D-loop に最も多く変異が見つかる。その意義であるが、これまでのところ、その他の領域の変異も含め、がん化との関係はほとんどが不明である。しかし、この D-loop (non-coding) 領域に生じた変異については、がん細胞にとってなんらかの点で有意に働くと考えざるを得ない。何故ならば、この領域の変異は、通常、mtDNA のコピー数と転写の低下を招き、最終的にはミトコンドリアの機能低下を引き起こす。そして、このような状況下では細胞の増殖は著しく抑制される。従って、D-loop 変異は細胞の増殖には不利なのである。しかし、その不利なはずの変異が多くのがんで維持されている。しかも細胞内の mtDNA のうち殆どが同じ変異をもつ状態、すなわちホモプラスミーの状態にまでなっているとされている。これらの知見に基づくと、上述のように想定せざるを得ないのである。

以上のように、がん化への積極的関与が示唆される D-loop 領域の変異であるが、これまでのところ、細胞の悪性化との関係は殆ど解析されていない。そこで、mtDNA (D-loop) 変異について、がん化との関わりを具体的に解明することを目的として、本研究を開始した。D-loop 変異の結果として直接的には mtDNA の複製/転写が抑制されるので、最初にそのような条件下で上皮細胞の形質変化を観察した。その結果、悪性化形質として〔上皮-間充織転換 (EMT)〕様の変化が引き起こされるという注目すべき結果を得た（業績 *Cancer Sci.*, 103:1803-1810 (2012)）。これは、mtDNA の複製/転写阻害が、悪性化形質誘導の積極的要因となることを強く示唆するものである。

一方、上述のように、呼吸鎖機能の不全下では細胞の増殖は顕著に抑えられる。意外にも細胞内の ATP 量はそのような状態下でも正常レベルに保たれていた。これは、解糖系の亢進により補完されたものと考えられ、呼吸鎖不全による増殖抑制は、ATP 産生以外の呼吸鎖機能の低下によるものと推測された。いずれにしても、mtDNA に変異を生じた細胞ががん化するに当たっては、悪性化形質を獲得する一方で、この増殖抑制を克服しなければならない。本課題では、この増殖抑制作用に対してがん細胞が獲得した克服機構の解明にも取り組んだ。取り組みに当たり、先ずこの呼吸鎖不全による増殖抑制に関するメカニズムについて解析し、この抑制が E2F 転写因子による転写制御ネットワークを標的とするものであることを明らかとした（業績 *Cancer Sci.*, 107: 963-971 (2016)）。具体的には、呼吸鎖不全下では E2F の転写機能が低下

し、その結果、下流の転写標的である一連の細胞周期制御因子の発現が低下することで、増殖が抑制されると考えられた。次いで、がん細胞によるこの増殖抑制機構に対する克服メカニズムを解析した。その結果、転写調節因子 high mobility group A2 (HMGA2) と Forkhead box M1 (FOXM1) という細胞周期制御転写複合体 DREAM の構成因子が、呼吸鎖機能が低下しているがん細胞内で高発現していること、ならびに、これらの機能が増殖抑制効果の克服に決定的な役割をはたしていることを見出した。すなわち、これら遺伝子機能を抑制するとがん細胞内で E2F 転写ネットワーク機能が呼吸鎖不全下のように低下してしまい、がん細胞は老化形質の誘導とともにやがて増殖しなくなった。

以上の結果は、HMGA2、或いは FOXM1 の高発現が、呼吸鎖不全による E2F 機能低下を克服、もしくは代償するのに必須であり、その発現を抑制することができれば、がん細胞に老化様形質を誘導し、その増殖を不可逆的に抑制できることを示している。臨床検体においても、がん部と非がん部を比較すると約 60% の検体のがん部でミトコンドリア機能が低下しており、さらにその低下と相関して HMGA2 が高発現していた。今後、HMGA2、FOXM1 の詳細な機能を明らかにすると共に、がん細胞内で HMGA2 と FOXM1 の発現を上方制御しているシグナルを同定し、そのシグナルを遮断することでがん細胞の増殖を阻止できるかどうか検討する予定である。それらの成果を基に、ミトコンドリア機能不全を背景とする腫瘍を対象とした新規個別化がん治療戦略の構築を目指したい。

【結果】

1) 呼吸鎖不全による悪性化形質誘導：呼吸鎖機能不全モデル細胞（低濃度 ethidium bromide 処理により mtDNA の複製/転写を特異的に阻害したマウス乳腺上皮細胞）を作製して細胞形態を観察した。その結果、E-cadherin の局在変化を主とする上皮形態の乱れが観察された。その他、インテグリンや matrix metalloproteinase 類の発現も変化しており、総体として呼吸鎖機能不全により細胞に悪性化形質（epithelial mesenchymal transition : EMT 様の変化）が誘導されることがわかった（業績 *Cancer Sci.*, **103**: 1803-1810 (2012), *Free Radical Res.* **45**: 672-680 (2011)）。

2) 呼吸鎖不全下での細胞増殖能の低下：一方、呼吸鎖機能不全に陥った細胞では、細胞の増殖が顕著に抑制される。これはがん化の観点からは不利であり、1) の結果と併せると、“呼吸鎖機能不全により細胞は悪性化形質を獲得するものの増殖能を失うため、最終的ながん化には至らない”ということになる。実際のがん細胞は、この増殖抑制機構を克服してがん化したと考えられる。そこで次に、この克服機構の解析のために、その前提となる呼吸鎖機能不全による増殖抑制機構を解析した。

低濃度 ethidium bromide 処理に加えて mtDNA 複製/転写調節因子 TFAM や呼吸鎖複合体 I のサブユニットに対する siRNA なども用いて呼吸鎖機能を低下させ、増殖抑制メカニズムについて検討した結果、呼吸鎖機能の低下による増殖能の低下は、意外にも細胞内 ATP 量の

低下によるものではなく、転写因子 E2F1 の発現と機能の低下を引き金とする細胞周期促進因子類（サイクリンなど）の下方制御が主な原因であることがわかった。要するに、呼吸鎖機能が低下すると E2F1 の転写機能が低下し、その結果、下流の標的遺伝子の発現が低下して、増殖が抑制されることがわかった（業績 *Cancer Sci.*, 107: 963-971 (2016)）。細胞周期制御転写複合体 DREAM の構成因子 FOXM1 も E2F の転写標的遺伝子であり、やはり呼吸鎖機能の低下により発現が低下した。

3) 呼吸鎖機能不全と HMGA2 発現：一方、DNA マイクロアレイの結果から、呼吸鎖機能不全モデル細胞内ではストレス応答関連遺伝子とともに胎児性抗原 HMGA2 の発現が上昇していることがわかった（業績 *J. Biochem.*, 146: 123-132 (2009)）。HMGA2 は DNA の高次構造を変化させて転写を制御する転写調節因子であり、脳下垂体腫瘍では、E2F1 の転写機能を亢進させて細胞増殖の促進に働くことが報告されている（*Cancer Cell*, 9: 459-471 (2006)）。これらのことから、HMGA2 が呼吸鎖機能低下状態下の E2F 機能低下の克服になんらかの役割を担っている可能性が考えられたので、ヒト hepatocellular carcinoma (HCC) 由来細胞株を用いて、さらに検討を加えた。最初に、呼吸鎖活性の低下と HMGA2 の発現レベルの相関について調べた。

そのために、入手した 7 種の HCC 細胞株、HepG2, HLF, HuH-7, JHH-1, 2, 4, 6 に primary hepatocyte を加えて、それらの mtDNA、mtRNA 量、ミトコンドリア膜電位を測定してミトコンドリア機能を評価し、同時に HMGA2 の発現レベルを調べた。その結果、先のモデル細胞の結果と一致して、ミトコンドリア機能の指標が低い細胞株で HMGA2 の発現レベルが上昇しており、これらのヒトがん由来細胞株でも呼吸鎖の低下と相関して HMGA2 の発現が上昇していることが示された。特に JHH-2, 4 で高発現していた。注目すべきことに、JHH-2, 4 の増殖能は呼吸鎖機能が低下しているにも拘らず、その他の細胞株と遜色なかった。

ちなみに、D-loop 領域の塩基配列に関しては、すべての細胞株で、mtDNA の複製転写制御因子 TFAM の結合領域周辺に複数の変異が認められ、特に HLF、JHH-2, 4 では、複数塩基にまたがる欠損や挿入が生じていた。核 DNA の変異については、多くの肝細胞がんでは変異が報告されている β catenin 経路の主要な因子 (β catenin、axin) について、主だったエキソンを調べたが、これらには変異は生じていなかった。

4) 臨床検体を用いた検討：3) の HCC 細胞株の結果を受けて、次に肝細胞がんの臨床検体を用いて、呼吸鎖機能と HMGA2 の発現の相関関係について検討した。ここでは、呼吸鎖機能の surrogate 指標として、ミトコンドリア DNA 由来転写産物(呼吸鎖複合体形成因子の mRNA) 量を測定した。約 40 の検体について調べたところ、半数以上の症例のがん部位で正常部と比較してミトコンドリア機能が低下しているとともに、HMGA2 の発現が検出され、それらの間には正の相関が認められた。以上の結果から、実際の生体内のがん化過程でも、呼吸鎖機能の不全を背景とする場合、多くの例で HMGA2 の発現上昇を伴うことが示された。

5) HMGA2 発現上昇の意義：以上の結果を受けて、次に HMGA2 が呼吸鎖機能低下細胞内で果たしている役割について検討した。呼吸鎖機能の低下とともに HMGA2 が高発現していた HCC 細胞株、JHH-24 について、HMGA2 の発現をノックダウンしてみたところ、増殖速度とコロニー形成能が顕著に低下した。それと同時に、細胞老化マーカー SA β -galactosidase 活性の上昇がみられた。また、E2F 転写制御ネットワークが、呼吸鎖不全状態下のように抑制されることがわかった。これらの結果は、HMGA2 が、実際の細胞内では観察結果と逆のこと、すなわち、呼吸鎖不全により低下した E2F 転写制御ネットワーク機能の再活性化に働き、細胞の増殖能の維持、または老化様増殖停止機構の誘導阻止に働いていることを示唆している。一方、肝細胞の分化誘導因子である HNF4 α の発現は、HMGA2 のノックダウンにより上昇した。すなわち、HMGA2 は、通常は HNF4 α の発現については抑制していることがわかった。HNF4 α は肝細胞内で SIP 等の EMT 制御因子の発現を抑制的に制御している。従って、HMGA2 の発現下では、HNF4 α の発現が抑制され、EMT 制御因子が誘導されると考えられる。1) に述べた悪性化形質の誘因のひとつは、この HMGA2 による HNF4 α 発現低下であると推察される。

以上より、HMGA2 は、呼吸鎖機能の低下した細胞内で、E2F 転写制御ネットワークの機能低下を阻止して増殖能の維持に働くとともに、HNF4 α の発現を抑制して悪性化形質 (EMT) の誘導にも寄与している可能性が示唆された。HMGA2 がこの二つの機能を併せ持つ意義は重要であり、HMGA2 が誘導されて始めて mtDNA に変異を持ち呼吸鎖機能が低下して悪性化形質を獲得した細胞が、さらに EMT により悪性化し、且つ増殖 (がん化) することが可能になると考えられる。以上のように、慢性炎症を母体とする肝細胞がんの発生・進展に重要な分子として HMGA2 を同定した。

6) 呼吸鎖機能不全細胞における FOXM1 の発現上昇とその意義

2) の結果から、呼吸鎖不全による増殖抑制は、E2F 転写制御ネットワークの機能低下がその主な原因であるとわかった。その結果、FOXM1 などの発現が低下するが、呼吸鎖機能が低下している HCC 株では、HMGA2 以外に FOXM1 の発現が高く維持されていた。この FOXM1 の高発現も、E2F 機能低下による増殖抑制効果に対する克服機構の一つであることが考えられた。そこで、RNAi によりその発現をノックダウンして検討した結果、HMGA2 の場合と同様に、がん細胞の増殖が不可逆的に抑制された。SA β -galactosidase の活性上昇、HNF4 α の発現の回復も同様に認められ、FOXM1 もがん細胞内で HMGA2 と同様の機能を果たしていることがわかった。

【考察】

これまで、がん遺伝子やがん抑制遺伝子が多数同定され、その変異による発がんのメカニズムが次々と明らかにされてきた。しかし、胃がんや肝細胞がんについては、ウイルス感染などを引き金とし、慢性炎症を背景として発症することが提唱されているものの、具体的な発がんの

メカニズムはよくわかっていない。肝細胞がんについては、いくつかのがん遺伝子、がん抑制遺伝子の変異が報告されているが、いまだその変異の意義やがん化メカニズムの詳細は明らかではない。一方、胃がんと肝細胞がんでは、他のがんに比べて mtDNA (D-loop) に変異を生じている割合が高い (*Ann. N.Y.Acad. Sci.*, 1042: 109-122 (2005))。そこで私たちは、仮説として、これらのがんでは『核 DNA 上のがん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異の代わりに、mtDNA (D-loop) 変異ががん化の誘因となっている』可能性を考えた。

この仮説に基づき、呼吸鎖機能に差がみられた複数の HCC 細胞株について、種々の検討を加えた結果、呼吸鎖機能不全を生じていた細胞株で、細胞の増殖維持に決定的な役割を果たしている遺伝子として上述のように HMGA2 と FOXM1 を同定した。この成果は、肝細胞がん以外にも、胃がんなど、慢性炎症を母体とするその他のがんに適応できると考えられ、それらのがん細胞に対する治療戦略への幅広い貢献が期待できる。炎症を母体とするがんでは、薬物の標的となる特異的な分子（過剰発現/変異がん遺伝子など）がいまのところ同定されておらず、他のがんの場合のような有効な分子標的治療がまだ可能でない。HMGA2 と FOXM1 を分子標的とする本提案は、呼吸鎖機能が低下しているがん細胞に対し、特異的に老化様の不可逆的増殖停止を誘導するものであり、実現できれば副作用の少ない優れた治療法となることが期待できる。以上のように、本成果は、「mtDNA 変異による呼吸鎖不全のがん化への関与」という新たなパラダイムに基づいて悪性腫瘍の個別化治療基盤構築に寄与が期待される意義深い内容であると考えられる。

【研究業績】

論文：

1. Linkage of E2F1 transcriptional network and cell proliferation with respiratory chain activity in breast cancer cells.

K. Mori, T. Uchida, M. Fukumura, S. Tamiya, M. Higurashi, H. Sakai, F. Ishikawa and M. Shibamura

(*Cancer Sci.*, **107**: 963-971. 2016)

2. Loss of anchorage primarily induces non-apoptotic cell death in a human mammary epithelial cell line under atypical focal adhesion kinase signaling.

F. Ishikawa, K. Ushida, K. Mori, and M. Shibamura

(*Cell Death & Dis.* Jan 22;6:e1619. 2015)

3. A mitochondrial thioredoxin-sensitive mechanism regulates TGF- β -mediated gene expression associated with epithelial-mesenchymal transition.

F. Ishikawa, E. Kaneko, T. Sugimoto, T. Ishijima, M. Wakamatsu, A. Yuasa, R. Sampei, K. Mori, K. Nose, and M. Shibamura

(*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **443**: 821-827. 2014)

4. A HIC-5- and KLF4-dependent mechanism transactivates p21Cip1 in response to anchorage loss.

Mori, K., Hamanaka, H., Oshima, Y., Araki, Y., Ishikawa, F., Nose, K. and Shibamura, M.

(*J. Biol. Chem.*, **287**:38854-38865. 2012)

5. Critical roles of the cAMP-responsive element-binding protein-mediated pathway in disorganized epithelial phenotypes caused by mitochondrial dysfunction.

Shibamura, M., Ishikawa, F., Kobayashi, M., Katayama, K., Miyoshi, H., Wakamatsu, M., Mori, K., and Nose, K.

(*Cancer Sci.*, **103**:1803-1810. 2012)

総説：

1. Intracellular redox and mitochondria regulation by transforming growth factor- β —its implication in induction of epithelial-mesenchymal transition.

M. Shibamura, K. Mori and F. Ishikawa

(*J. Cell Signaling*, doi:10.4172/JCS.1000106. 2016).

2. 細胞接着斑タンパク質 Hic-5 による足場依存性細胞増殖の制御機構
柴沼質子

(*生体の科学* **64**: 239-243. 2013)

3. A mobile molecular scaffold regulating the anchorage dependence of cell growth.

Shibanuma, M., Mori, K., and Nose, K.

(*Int J. Cell Biol.*, 426138. 2012)

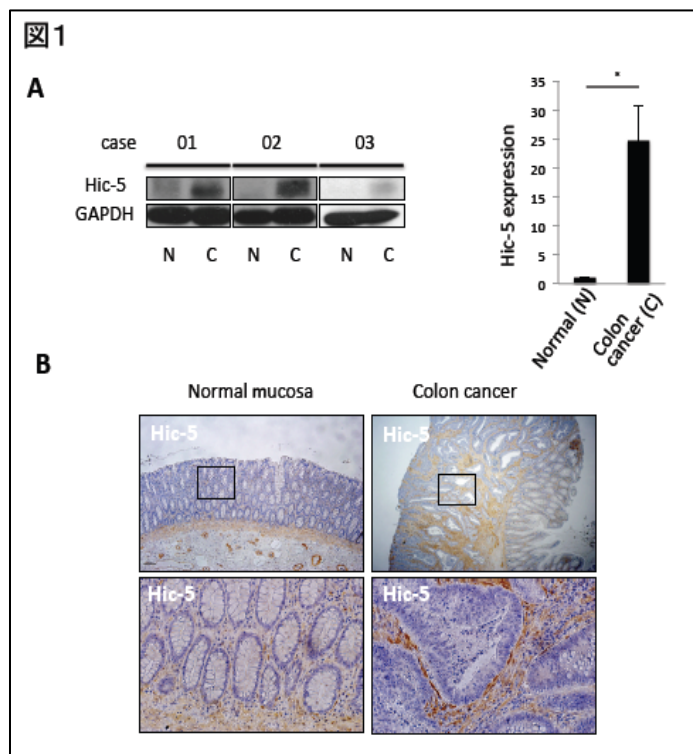
細胞接着斑分子を標的とした癌治療戦略の構築
(最終報告)

宮崎 章

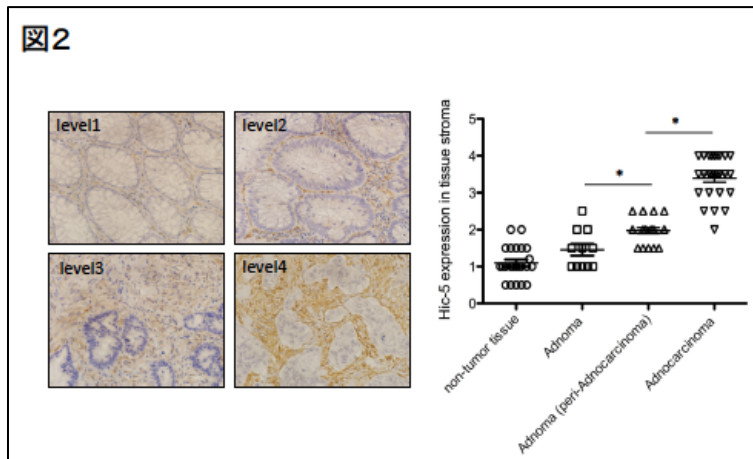
癌組織の約半分は間質細胞から成る。すなわち癌細胞の形質は細胞外微小環境制御を受けており、とりわけ癌幹細胞のニッチ形成という側面から間質細胞および細胞外マトリクス (extracellular matrix: ECM) の重要性が認識されている。現在 ECM は組織構築を保持するだけではなく、接触している細胞の生存、発生、移動、増殖、形態、機能などを調節する生理活性物質であることが明らかとなっており、この ECM による恒常性維持の破綻が炎症や癌と深く結びつくと考えられている。ECM と細胞間の相互作用に重要な役割を果たしているのが、インテグリンを軸として形成される細胞接着斑 (focal adhesion: 接着斑) 装置である。接着斑は細胞-ECM 間の接着のみならず、機械的応力の伝達、細胞骨格調節、シグナル伝達などに関わる多機能構造体である。この構造体を形成するタンパク質として、FAK (focal adhesion kinase)、Paxillin、Talin、Vinculin、Zyxin などの細胞接着斑構成分子群が知られており、現在これらの分子の中には、創薬のターゲットとなることが期待されるものが存在する。

本研究では細胞接着斑構成分子の一つである Hic-5 (hydrogen peroxide-inducible clone-5) に着目し、Hic-5 の発癌への関与および役割について解析を行った。

まず大腸癌患者由来組織を用い非癌部および癌部間での Hic-5 発現量を検討したところ、癌部で Hic-5 の顕著な発現上昇が認められた。そこで Hic-5 高発現細胞を同定するためヒト大腸腺癌 9 例を用いて Hic-5 の組織免疫染色を行ったところ、Hic-5 は

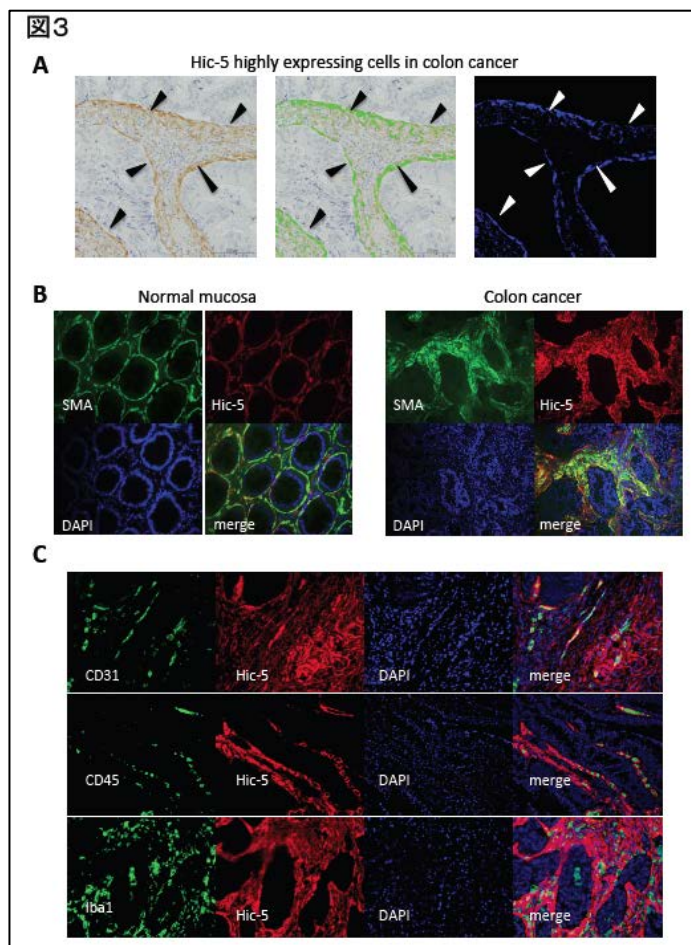


全ての症例で癌間質繊維芽細胞（CAF：Cancer associated fibroblast）に発現していることが明らかとなった（図 1）。さらに Hic-5 発現は、adenoma-carcinoma sequence（腺腫—がん連関）過程において発現が上昇することが示された（図 2）。また間質での Hic-5 高発現



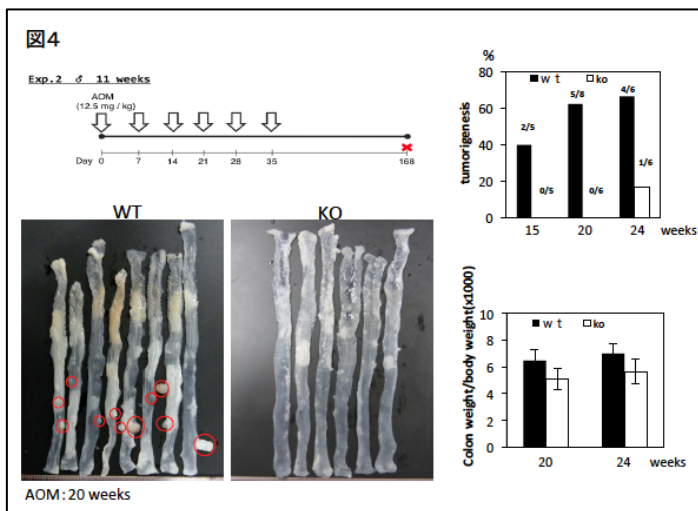
細胞に関して、特に癌化上皮細胞と隣接している CAF では Hic-5 の高発現が確認された(図 3A)。CAF 以外では、Hic-5 と CD31、CD45、Iba1 などの各種マーカーとの共染色の結果より、間質のマクロファージや造血前駆細胞での Hic-5 発現は観察されず、血管内皮細胞にわずかに発現することが明らかとなった（図 3B, C）。

次に Hic-5 の発癌過程への積極的な関与の有無を明らかにするため、Hic-5 欠損マウスを用



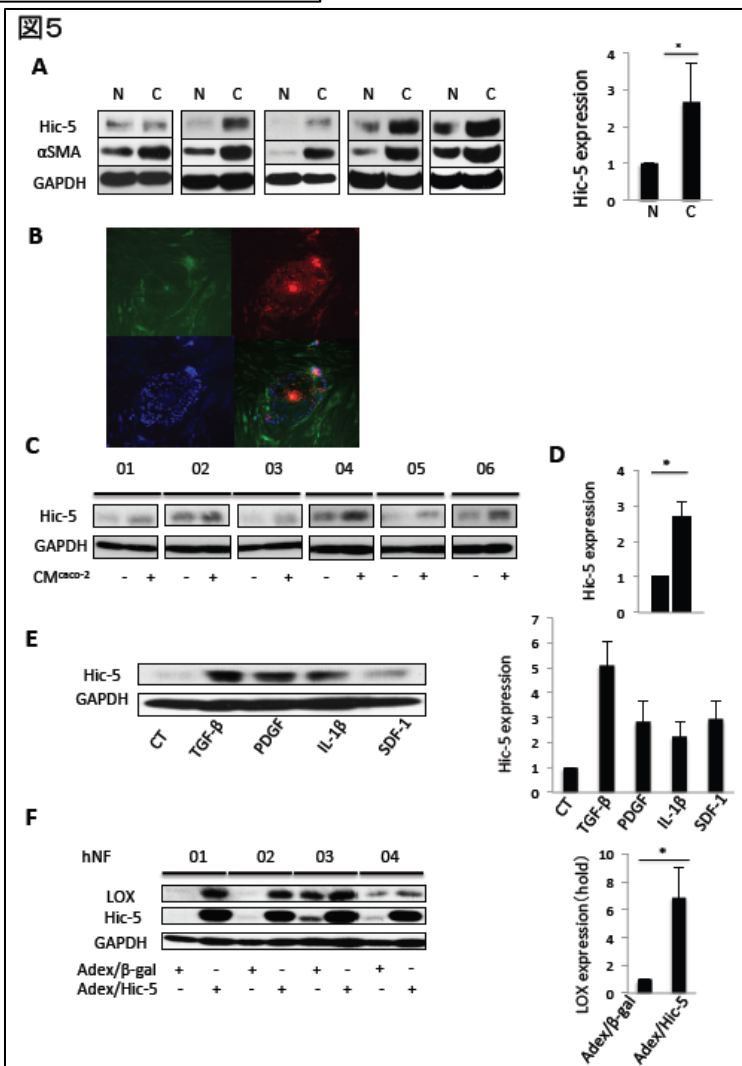
いて Azoxymethane 投与によるマウス大腸癌発癌頻度を検討した。その結果、Hic-5 欠損マウスで発癌頻度の顕著な抑制が観察された（図 4）。またマウス大腸癌組織においても同様に、癌間質に Hic-5 の高発現が認められた。これらマウス癌間質 Hic-5 陽性繊維芽細胞は α -SMA 陽性であったことから、やはり癌間質の CAF に Hic-5 が高発現していると考えられた。つまりマウス、ヒト両方の大腸癌組織において Hic-5 は CAF に高発現しており、かつ Hic-5 を欠損させることで大腸癌の発症がほぼ完全に抑制されることが示された。そこで次に、Hic-5 欠損マウスで観察された発癌頻度抑制メカニズムを解析

するため、ヒト大腸癌組織より CAF を分離培養した。非癌部から分離した繊維芽細胞 (N) に対して、癌部より分離した CAF (C) ではやはり Hic-5 の発現が誘導されていた (図 5)。さらに大腸癌患者非癌部から分離



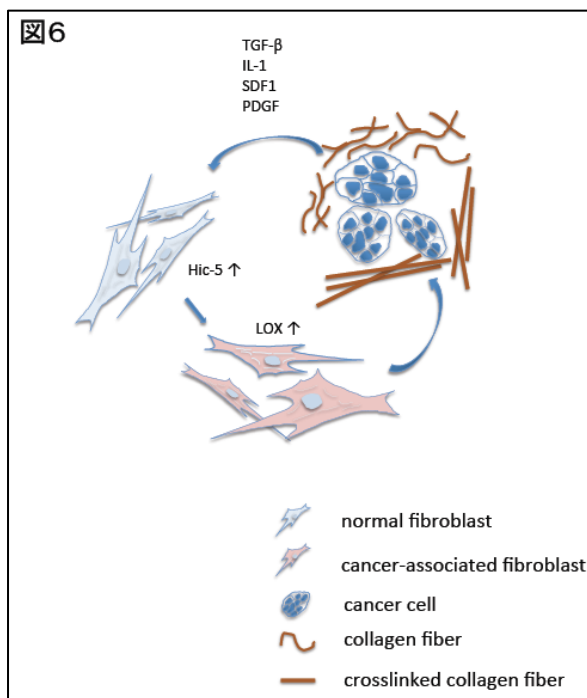
培養した繊維芽細胞をヒト大腸癌細胞株 Caco-2 の培養上清で刺激したところ Hic-5 の発現が誘導された (図 5C, D)。そこで大腸癌細胞から放出されることが知られている複数のサイトカインを用いて同様の実験を行ったところ、TGF- β 刺激で線維芽細胞内の Hic-5 発現量増加が認められた (図 5E)。TGF-

β は癌間質の ECM リモデリングに深く関与していることが知られているため、CAF 内の Hic-5 が ECM リモデリング制御を介し発癌過程に関与する可能性について、Hic-5 過剰発現系を用いてコラーゲンや MMPs などの発現解析を行ったところ、I 型コラーゲンとエラスチンの架橋を行う lysyl oxidase (LOX) の発現が Hic-5 により発現誘導されることを見出した (図 5F)。正常部位の間質に比べて癌間質はその硬度を増すと共に、ECM は癌細胞と並行に線状集積する。癌細胞生存に有利な線状集積した硬い ECM を形成するためには ECM 分子間の架橋が重要で



ありそれを担うのが LOX である。このことから、癌細胞が周囲の間質細胞に向けて放出した TGF- β に応答して CAF 内の Hic-5 発現が上昇し、それにより LOX 発現が誘導される癌細胞の分裂増殖に有利な ECM 環境、強いては癌ニッチが形成されるのではないかと想定される(図 6)。現在 siHic-5 を用いてヒト CAFs の Hic-5 発現抑制による癌間質線維芽細胞形質のさらなる変化について、LC/MS を用いた網羅的解析、同時に細胞外環境リモデリングの観点から ECM 産生量および MMPs 活性変化も詳細な検討を加えている。

またこの間、並行して解析を行ってきた肝繊維化発症への Hic-5 の関与が明らかとなった。肝線維化、殊に肝硬変は肝細胞癌発症と深く関わっている。肝臓での筋線維芽細胞の主な供給源は肝臓星状細胞 (HSCs : Hepatic stellate cells) であると考えられており、我々はヒト線維化肝の組織解析および肝線維化モデルマウスを用いた解析より、Hic-5 は活性型 HSCs で線維化の進行に伴い発現が上昇することや、野生型マウスと比較して Hic-5 欠損マウスでは顕著に肝線維化が抑制されることを報告した。そのメカニズムとして、通常 Hic-



5 は TGF- β による HSCs の活性化に伴った Smad7 の抑制を介して、コラーゲン I の発現を誘導することが明らかとなっている。

以上、Hic-5 欠損マウスでの大腸癌発症、肝線維化抑制効果からこの分子が臨床応用のためのターゲットとなりうる可能性があると考えられる。癌病変部では、癌細胞由来のサイトカインや細胞外基質分解酵素などによる細胞外環境のダイナミックな変化、リモデリングが持続的に起きている。よって本研究により癌組織における細胞外微小環境シグナルを担う細胞接着斑分子の一つが同定できた。また当該分野のみならず、この分子がこれまでに持つ背景から動脈硬化、術後再狭窄など血管病変の進行過程に血管リモデリングが主体をなしている関連分野の病態解明が期待できる。さらに Hic-5 は活性酸素種 (ROS) により発現誘導される分子という背景を持つことから、Hic-5 による細胞外環境変化への詳細な応答メカニズムが解明されることで、多様な生理的シグナルを同時に担う ROS ではなく、ROS 下流で病変を引き起こす 1 機能分子を標的にできる。このことから ROS が関与する種々の疾患に対する標的分子を絞

った副作用の少ない予防法・治療法の発案が可能になると考える。

Hic-5 は他のグループのマウスを用いた癌転移実験により、乳癌細胞株 (MDA-MB-231) 内の Hic-5 量を低下させると肺転移が顕著に抑制されることが報告されている。また現在イギリスで第 I 相臨床試験が行われている開発中の抗癌剤 GSAO [4-(N-(S-glutathionylacetyl) amino) phenylarsenoxide] の作用機序の一つとして Hic-5 のリン酸化の関与が知られている。本研究における細胞接着斑分子 Hic-5 を介した細胞外微小環境制御シグナルの解析結果から、大腸癌治療の新たな治療ターゲットの新規分子として Hic-5 が提唱できたと考える。現在並行してタンパク構造の X 線結晶構造解析に着手しており、構造が解けた場合 *in silico* で Hic-5 機能阻害シード化合物の探索が可能となる。よって本研究は大腸癌治療への展開を図る新規創薬ターゲットを発掘するという重要な意義を持つ研究となった。

Original papers

1. Terasaki M, Nagashima M, Watanabe T, **Miyazaki A**, Hirano T. Effects of PKF275-055, a dipeptidyl peptidase-4, on the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-null mice. *Metabolism* 2012;61(7):974-977.
2. Koya T, Miyazaki T, Watanabe T, Shichiri M, Atsumi T, Kim-Kaneyama JR, **Miyazaki A**. Salusin- β accelerates inflammatory responses in vascular endothelial cells via NF- κ B signaling in LDL receptor-deficient mice *in vivo* and HUVECs *in vitro*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;303(1):H96-H105.
3. Kim-Kaneyama JR, Miyauchi A, Lei XF, Arita S, Mino T, Takeda N, Kou K, Eto K, Yoshida T, Miyazaki T, Shioda S, **Miyazaki A**. Identification of Hic-5 as a novel regulatory factor for integrin α IIb β 3 activation and platelet aggregation in mice. *J Thromb Haemostat*. 2012;10(9):1867-1874.
4. Masunaga A, Nagashio R, Iwamoto S, Takeyama N, Sato Y, **Miyazaki A**, Mitsuya T. A case of pulmonary papillary adenoma: possible relationship between tumor histogenesis/tumorigenesis and fibroblast growth factor 2 IIIb. *Pathol Int*. 2012;62(9):640-645.
5. Kamiyama T, Watanabe H, Iijima M, **Miyazaki A**, Iwamoto S. Coexpression of CCR6 and CD146 (MCAM) is a marker of effector memory T-helper 17 cells. *J Dermatol*. 2012;39(10):838-842.
6. Sasabe N, Keyamura Y, Obama T, Inoue N, Masuko Y, Igarashi Y, Aiuchi T,

Kato R, Yamaguchi T, Kuwata H, Iwamoto S, **Miyazaki A**, Hara S, Yoshikawa T, Itabe H. Time course-changes in phosphatidylcholine profile during oxidative modification of low-density lipoprotein. *Lipids Health Dis* 2014 Mar 14;13:48. doi: 10.1186/1476-511X-13-48.

7. Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Arita-Okubo S, Offermanns S, Itabe H, Miyazaki T, **Miyazaki A**. Identification of hydrogen peroxide-inducible clone 5 as a novel scaffold for the mitogen-activated protein kinase kinase 4/p54 c-Jun N-terminal kinase pathway in the development of abdominal aortic aneurysms. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(3):e000747.

8. Kigawa Y, Miyazaki T, Lei XF, Nakamachi T, Oguchi T, Kim-Kaneyama JR, Taniyama M, Tsunawaki S, Shioda S, **Miyazaki A**. NADPH oxidase deficiency exacerbates angiotensin II-Induced abdominal aortic aneurysms in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(11):2413-2420.

9. Arita-Okubo S, Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Fu WG, Ohnishi K, Takeya M, Miyauchi A, Honda H, Itabe H, Miyazaki T, **Miyazaki A**. Role of Hic-5 in the formation of microvilli-like structures and the monocyte endothelial interaction that accelerates atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2015;105(3):361-371.

10. Miyazaki T, Taketomi Y, Saito Y, Hosono T, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Arata S, Takahashi H, Murakami M, **Miyazaki A**. Calpastatin counteracts pathological angiogenesis by inhibiting suppressor of cytokine signaling 3 degradation in vascular endothelial cells. *Circ Res*. 2015;116(7):1170-1181.

11. Jamba A, Kondo S, Urushihara M, Nagai T, Kim-Kaneyama JR, **Miyazaki A**, Kagami S. Hydrogen peroxide-inducible clone-5 regulates mesangial cell proliferation in proliferative glomerulonephritis in mice. *PLoS One* 2015;10(4):e0122773

12. Furukawa M, Kim-Kaneyama JR, Yamada M, Senda A, Manabe A, **Miyazaki A**. Cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human gingival fibroblasts in vitro. *Oper Dent*. 2015;40-4:430-439.

13. Lei XF, Fu W, Kim-Kaneyama JR, Omoto T, Miyazaki T, Li B, **Miyazaki A**. Hic-5 deficiency attenuates the activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis through upregulation of Smad7 in mice. *J Hepatol*. 2016;64(1):110-117.

14. Sato C, Iso Y, Mizukami T, Otabe K, Sasai M, Kurata M, Sanbe T, Sekiya I, **Miyazaki A**, Suzuki H. Fibroblast growth factor-23 induces cellular senescence in human mesenchymal stem cells from skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;470(3):657-662.

15. Matsumoto M, Nakamachi T, Watanabe J, Sugiyama K, Ohtaki H, Murai N, Sasaki S, Xu Z, Hashimoto H, Seki T, **Miyazaki A**, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is involved in adult mouse hippocampal neurogenesis after stroke. *J Mol Neurosci*. 2016;59(2):270-279.
16. Miyazaki T, Tonami K, Hata S, Aiuchi T, Ohnishi K, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Takeya M, Itabe H, Sorimachi H, Kurihara H, **Miyazaki A**. Calpain-6 confers atherogenicity to macrophages by dysregulating pre-mRNA splicing. *J Clin Invest*. 2016 in press.
17. Sasaki S, Watanabe J, Ohtaki H, Matsumoto M, Mukai N, Nakamachi T, Hannibal J, Fahrenkrug J, Hashimoto H, Watanabe H, Sueki H, Honda K, **Miyazaki A**, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes eccrine gland sweat secretion. *Br J Dermatol*. 2016 in press.

Reviews

1. Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Arita S, Miyauchi A, Miyazaki T, **Miyazaki A**. Hydrogen peroxide-inducible clone 5 (Hic-5) as a potential therapeutic target for vascular and other disorders. *J Atheroscler Thromb*. 2012;19(7):601-607.
2. Miyazaki T, Koya T, Kigawa Y, Oguchi T, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, **Miyazaki A**. Calpain and Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20(3):228-237.
3. Kigawa Y, Miyazaki T, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, **Miyazaki A**. Functional heterogeneity of NADPH oxidases in atherosclerotic and aneurysmal diseases. *J Atheroscler Thromb*. 2016 in press.

肺癌はがん死で最も多い原因であり、このうち約 60%の患者では診断時に転移を伴う進行期であることが知られる。このような進行期肺癌症例は化学療法の適応となるが、治療時に有効であった症例も全例が抗がん剤耐性となり再発する。このことから、がん細胞の耐性や転移に関する分子機構を解析することは、がんの治療成績を向上させるうえで極めて重要である。我々は、非小細胞肺癌を対象として、特にヒト上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) の耐性機構解析およびその克服法の研究を行っている。本研究課題「新たなパラダイムに基づく悪性腫瘍の個別化診断・治療法の研究基盤構築」においては、(1) がんの耐性に関与する TGF- β 1 誘導上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) に及ぼす Syndecan-4(SDC-4)の影響とその分子機構解析、(2) afatinib に対する耐性非小細胞肺癌における耐性機序の解析、(3) afatinib、抗インスリン様受容体リガンド抗体の併用による EGFR-TKI 耐性克服法の開発について研究を行った。この他、平成 27 年 11 月より東京大学医科学研究所附属病院 抗体・ワクチンセンターと共同で、小細胞肺癌患者の末梢血より循環腫瘍細胞(CTC)を回収し、これらの分子レベルの解析により治療効果の発現や小細胞肺癌の生物学的特性に関する検討を実施している (昭和大学ヒトゲノム遺伝子解析倫理委員会承認番号: 227 号、東京大学医科学研究所倫理審査委員会承認番号: 27-43-1030)。

1. TGF- β 1 誘導上皮間葉転換における Syndecan-4 の関与

上皮間葉転換(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)は、上皮細胞がその細胞極性や周囲細胞との細胞接着機能を失い、遊走、浸潤能を得ることで間葉系様の細胞へと変化するプロセスであり、発生時の組織構築、創傷治癒などの過程において重要な役割を果たしている。がん組織においては、がん細胞が腫瘍組織を離れ転移をきたす過程、また抗がん剤に対する高度耐性の形質であるがん幹細胞への変換に EMT が関与することが報告されている。がん細胞における EMT 分子機構を解明することは抗がん剤耐性、転移の抑制を考える上で非常に重要である。

Syndecan(SDC)は細胞膜表面に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカン群で、4種(SDC1-4)が知られている。これらは、特に細胞-細胞間及び細胞-細胞外基質間の接着、細胞の移動、増殖に関与していることが知られる。この中で SDC-4 は、integrin を介した接着装置に高濃度で存在し、接着シグナル、actin stress fiber の構築に関与することで、細胞の形態調節ならびに細胞移動に関与している。SDC-4 は肝細胞がん、悪性中皮腫で高発現することが報告されているが、EMT に対する役割はこれまで明らかとなっていない。我々はヒト非小細胞肺癌 (NSCLC)株 A549 を用いて TGF- β が誘導する EMT の分子機構に SDC-4 が関与していること

を見出し、その分子機構について解析を行った。

TGF- β の刺激により、細胞の接着分子である E-cadherin が低下し、vimentin、Snail、Slug が上昇することで、A549 細胞は敷石状から紡錘形に形態を変化させ、EMT の誘導がおこるが、興味深いことに同時に SDC-4 も増加することが明らかとなった(Fig. 1)。TGF- β 誘導 EMT の過程における SDC-4 の役割を明らかにする目的で、SDC-4 siRNA を用いて knockdown を行ったところ、TGF- β 刺激による vimentin、Snail の上昇が抑えられ(Fig. 2)、

Fig. 1

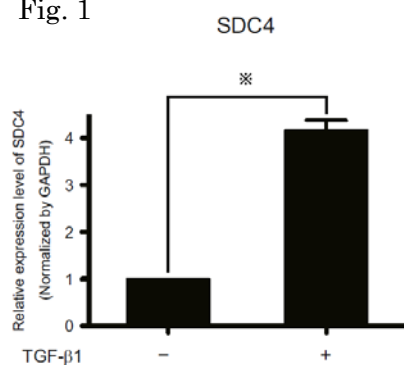


Fig. 2

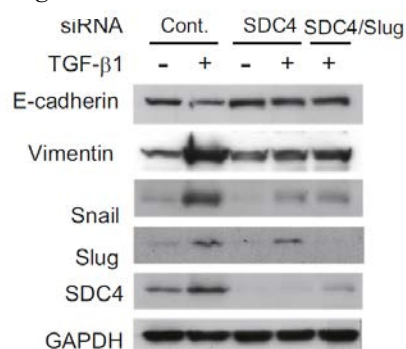
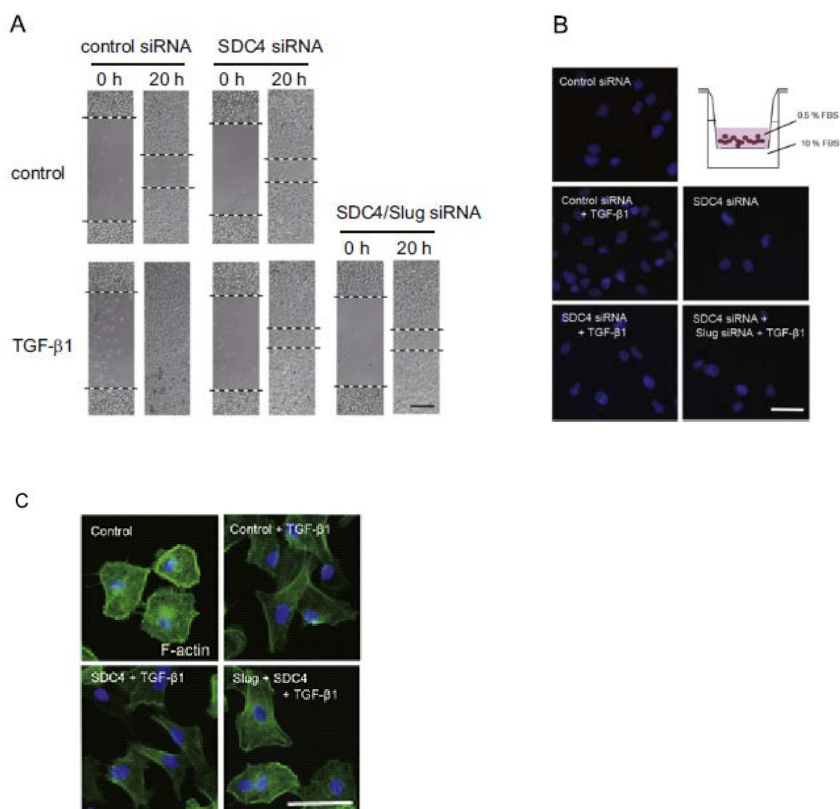


Fig. 3



細胞の移動度(Fig.3A)、浸潤性が有意に低下した(Fig. 3B)。E-cadherin については TGF- β 及

び Snail 発現と無関係に、SDC-4 knockdown により上昇する傾向を認めた。SDC-4 は細胞外ドメインが遊離して細胞増殖シグナルに関与することが知られるが、中和抗体を用いた検討では、TGF- β 関連シグナルに遊離細胞外ドメインは関与しない。一方、SDC-4 の knockdown は、Slug の発現には影響を与えず(Fig. 2)、また細胞の形態、actin stress fiber の構造は変化しなかった(Fig. 3C)。このことから、Slug の siRNA を用いて、同様の観察を行った。この結果、Slug のみの knockdown によっても、TGF- β による EMT は抑制できないが、SDC-4 と Slug の double knockdown を行った場合には紡錘形の細胞形態の変化が抑制され、actin stress fiber の形成が低下することが明らかとなった(Fig. 3C)。

以上の観察から、SDC-4 は Snail 誘導シグナルの上流に存在し、TGF- β 刺激により SDC-4 発現が上昇することで Snail の発現が上昇する。さらに、Snail の上昇により、細胞の移動度、浸潤性を亢進させる。一方、Slug は SDC-4 を介するシグナルと独立して TGF- β 刺激により発現上昇をきたし、Snail と協調的に actin stress fiber の構築することで細胞形態を紡錘形へと変化させることが明らかとなった。一方、E-cadherin については SDC-4 の knockdown のみで発現上昇が認められることから、SDC-4 による TGF- β と独立した制御機構が存在することが示唆された。今後、肺癌患者の臨床検体を用いた検討を行うことで、SDC-4 発現と予後、薬剤感受性、転移の頻度との相関について解析を進めたい。

Up-regulation of Syndecan-4 contributes to TGF- β 1-induced epithelial to mesenchymal transition in lung adenocarcinoma A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 517: 1-7, 2016

2. afatinib 耐性非小細胞肺癌における耐性機序の解析

上皮成長因子受容体(EGFR)チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) は、活性化突然変異 EGFR を発現する NSCLC 患者で有効であり、この治療により少数の長期生存例も認められるようになった。しかしながら、その大部分は 1 年以内に再発することから、EGFR-TKI に対する耐性化は NSCLC 治療の上で大きな障壁となっている。可逆的 EGFR-TKI(gefitinib, erlotinib)の耐性については、EGFR の 2 次突然変異(T790M)が約 50%を占め、そのほか MET、IGF-1R 等のバイパスシグナルの亢進、小細胞肺癌への細胞形質の変化等の分子機構が明らかにされている。特に 2 次突然変異 EGFR に対しては、T790M 変異にも有効な第 3 世代 EGFR-TKI(osimertinib)が開発され、耐性患者に対する有効な治療法となっている。第 2 世代の afatinib は、汎 EGFR family 受容体に対する不可逆的 EGFR-TKI としての特徴を有し、活性化突然変異 EGFR を発現する NSCLC に対する治療薬として臨床応用されているが、本薬剤に対する耐性機序については十分に明らかにされていない。

我々は、活性化突然変異 EGFR を発現し EGFR-TKI に高感受性のヒト NSCLC 細胞株 PC-9

を用いて、薬剤の持続接触を行うことで親株に比して afatinib に 1000 倍以上耐性となった獲得耐性株 3 株(PC-9AFR1、PC-9AFR2、PC-9AFR3)を樹立し(Fig. 1)、それぞれの耐性機序について解析を行った。この結果、3 種の耐性細胞はそれぞれ異なる機序により、afatinib 耐性形質を獲得していることが明らかとなった。

PC-9AFR1、PC-9AFR2 では活性化 EGFR 突然変異アレルが減少し、代わりに野生型 EGFR の発現が亢進した。一方、PC-9AFR3 では T790M EGFR 突然変異が認められ、3 世代 EGFR-TKI (osimertinib、rociletinib) に対する感受性が認められたことから(fig. 2)、これまでの可逆的 EGFR-TKI と同様に、2 次突然変異が afatinib 耐性に寄与していることが明らかとなった。PC-9AFR1 では野生型 KRAS の遺伝子増幅(Fig. 3A, B)及び、バイパスシグナルとしてリン酸化 IGF-1R の発現増加を認めた。本細胞株では、1) IGF-1R 阻害剤(OSI906)と MEK 阻害剤(selumetinib)の併用により AKT, ERK のリン酸化が低下し apoptosis が誘導

Fig. 1

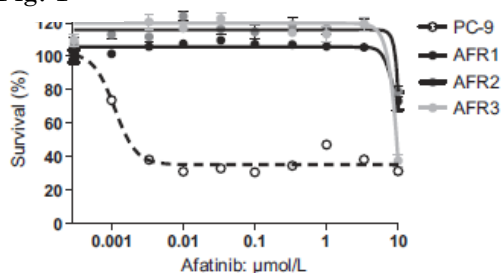


Fig. 2

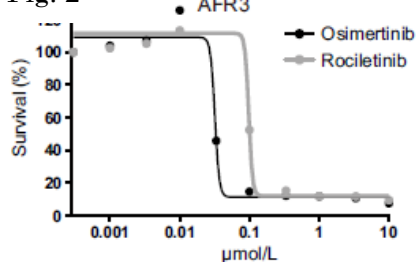


Fig. 3

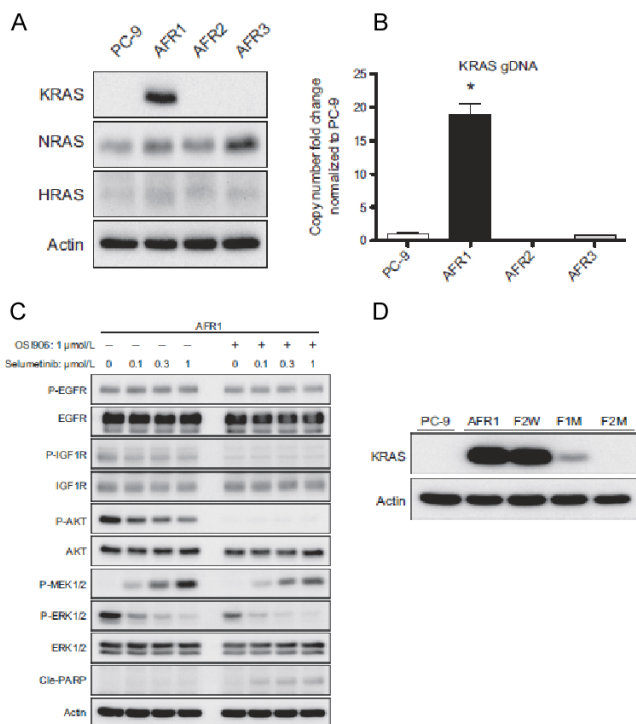
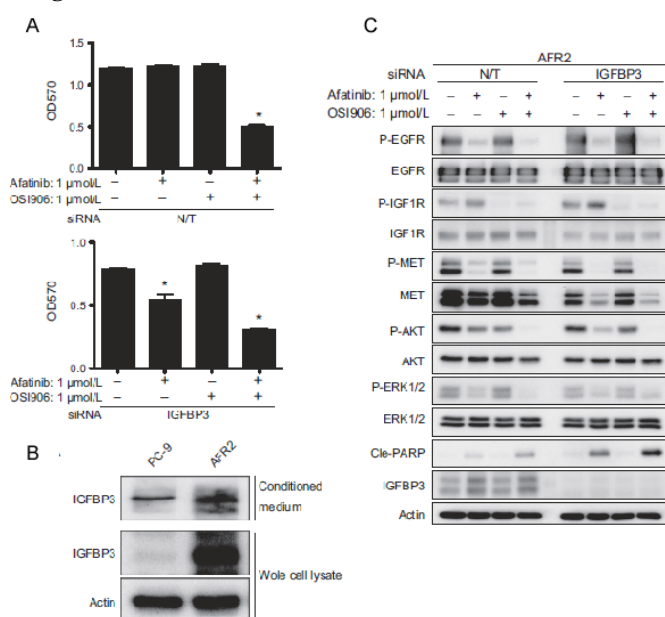


Fig. 4



されること (Fig. 3C)、2) 薬剤非接触条件での培養した細胞株 (PC-9F2W, PC-9F1M, PC-9F2M) において、耐性度の低下に伴って KRAS 発現も低下することから (Fig. 3D)、野生型 KRAS の遺伝子増幅、IGF-1R 活性化が協調的に afatinib 耐性に寄与していると考えられる。PC-9AFR2 ではリン酸化 IGF-1R の活性化を認め、afatinib と OSI906 の併用が奏功することから、バイパスシグナルとして IGF-1R が耐性に寄与することが明らかとなった (Fig. 4A)。興味深いことに、この細胞株では IGF-1R リガンド結合蛋白質 IGFBP-3 の発現亢進を認めた (Fig. 4B)。増加した IGFBP3 は IGF1R と AKT の持続性のリン酸化に関与し、同蛋白質の knockdown により afatinib による耐性が部分的に解除される (Fig. 4A, 4C) ことから、afatinib 耐性に寄与していると考えられた。

今回の検討で、afatinib 耐性は多因子性に誘導されることが明らかとなった。臨床において、EGFR-TKI 耐性となった NSCLC 患者に休薬期間をおくことで EGFR-TKI に対する感受性が回復する現象が観察されているが、今回の知見で野生型 KRAS の遺伝子増幅による耐性化は可逆的であることから、この現象を説明する理由となる可能性がある。今回の我々の結果は、活性化 EGFR 突然変異を発現する NSCLC 患者のための、次世代の治療学に重要な情報を提供すると考えられる。今後、これらの新しい耐性メカニズムについて、EGFR-TKIs に感受性を回復した患者材料を含む臨床検体での評価を行い、個別がん化学療法に向けた新規治療法の開発を目指した研究につなげたい。

3. afatinib、抗インスリン様受容体リガンド抗体 (BI 836845) 併用による EGFR-TKI 耐性克服法の開発

インスリン様成長因子 (IGF-1、IGF-2) は、細胞増殖と生存(を促進する。IGF-1R に対する両リガンドの結合は、IRS タンパク質をリン酸化し、Akt/mTOR と下流のシグナル伝達経路を活性化する。IGF-1R 及び IGF-1R-インスリン受容体(IR)との複合型受容体は肺がん、乳がん、前立腺がんを含む多くの腫瘍組織で発現し、患者の予後不良因子としての関連性が知られている。このことから、IGF-1R を分子標的とする抗がん剤(低分子 IGF-1R-TKI, 抗体)が開発され、前臨床試験では良好な成績が得られている。しかし、進行 NSCLC 患者を対象とした EGFR-TKI(erlotinib)と IGF-1R 特異的抗体(figitumumab)併用第 3 相試験 (ADVIGO 1018) では有効性を証明できず、毒性 (主に高血糖) が認められたため、早期に終了した。

BI 836845 は IGF-1 と IGF-2 のヒト化中和抗体であり、IGF-1R シグナルを標的とした第 3 の阻害剤として、臨床試験が進められている。低分子 IGF-1R-TKI と異なり、この薬は IR で直接的な交差反応を持たないため、ホストの糖代謝に影響を及ぼすことなく IGF-1R シグナルを抑制する。我々は NSCLC を対象として afatinib と BI 836845 の併用療法の効果と分子機構について検討した。

Table 1

Combination effect of afatinib and IGF-1R inhibitors

	BM 9-754807	NPD-ADW742	BI 836845
PC-9	○	○	○
PC-9AFR2	○	○	○
PC-9AFR3	○	○	○
PC-9/ZD	○	○	○
PC-9ME T200	-	-	-
PC-9MET1000	-	-	-
HCC827	ND	ND	○
A431	○	○	○
H1975	○	○	○
PC-14	-	-	-
A549	-	○	-
LC-19q	○	○	NT
293_mock	-	△	-
293_pEGFR	△	○	-
293_p315	○	○	○

Note: Combination effects between afatinib and IGF-1R-TKIs were evaluated by combination index. ○, synergistic; △, additive; - , sub additive; ND, not detected; NT, not tested

Fig. 1

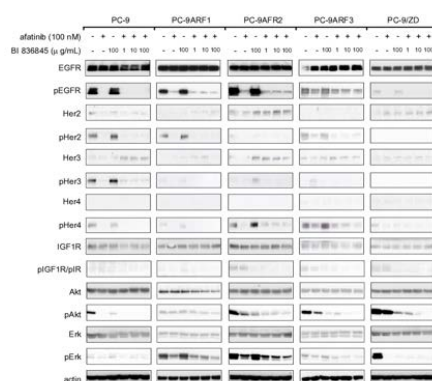
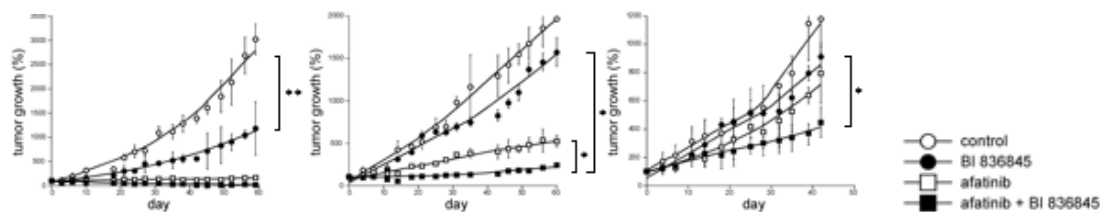


Fig. 2 PC-9

PC-9AFR2

PC-9/ZD



EGFR-TKI 耐性株を含む NSCLC 細胞株パネルを用いて、afatinib と BI 836845 の組合せ効果を評価した結果、BI 836845 は単独ではほとんど細胞毒性を持たないが、EGFR-TKI 耐性株 (PC-9AFR2, PC-9ZD)を含む大部分の NSCLC 株で相乗的な抗腫瘍効果を示したが、他のバイパスシグナル (MET の過剰発現、変異型 K-RAS) を有する細胞株では認められなかった (Table. 1)。EGFR-TKI 耐性株を用いた検討で、この併用療法はそれぞれを単独で使用するのに比して、AKT/mTOR シグナル経路を強く抑制し、これに伴ってアポトーシスが誘導されることが確かめられた (Fig. 1)。また、この併用療法は EGFR-TKI 耐性株 (PC-9AFR2, PC-9ZD) のマウス移

植腫瘍に対しても、体重減少、高血糖等の有害事象をきたすことなく、相乗的に作用することを確認した (Fig. 2)。

以上から、afatinib と BI 83684 を用いた併用化学療法は、NSCLC に対する新たな治療的戦略であると考えられる。

1. Yamaoka T, Ohmori T, Ohba M, Arata S, Murata Y, Kusumoto S, Ando K, Ishida H, Ohnishi T, Sasaki Y. Distinct Afatinib Resistance Mechanisms Identified in Lung Adenocarcinoma Harboring an EGFR Mutation. *Mol Cancer Res.* 2017, in press.
2. Yamaoka T, Ohmori T, Ohba M, Arata S, Kishino Y, Murata Y, Kusumoto S, Ishida H, Shirai T, Hirose T, Ohnishi T, Sasaki Y.: Acquired Resistance Mechanisms to Combination Met-TKI/EGFR-TKI Exposure in Met-Amplified EGFR-TKI-Resistant Lung Adenocarcinoma Harboring an Activating EGFR Mutation. *Mol Cancer Ther.* 15(12):3040-3054 (2016)
3. Hirose T, Fujita K, Kusumoto S, Oki Y, Murata Y, Sugiyama T, Ishida H, Shirai T, Nakashima M, Yamaoka T, Okuda K, Ohmori T, Sasaki Y.: Association of pharmacokinetics and pharmacogenomics with safety and efficacy of gefitinib in patients with EGFR mutation positive advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 93:69-76. (2016)
4. Ito H, Sato J, Tsujino Y, Yamaguchi N, Kimura S, Gohda K, Ito S, Murakami K, Onimaru M, Ohmori T, Ishikawa F, Inoue H.: Long-term prognostic impact of circulating tumour cells in gastric cancer patients. *World Journal of Gastroenterology.* (2016) in printing
5. Ito H, Yamaguchi N, Onimaru M, Kimura S, Ohmori T, Ishikawa F, Sato J, Ito S, Inoue H.: Change in number and size of circulating tumor cells with high telomerase activity during treatment of patients with gastric cancer. *Onco Lett 電子版* (2016)
6. Toba-Ichihashi Y, Yamaoka T, Ohmori T, Ohba M.: Up-regulation of Syndecan-4 contributes to TGF- β 1-induced epithelial to mesenchymal transition in lung adenocarcinoma A549 cells. *Biochem Biophys Res* 5, 1-7 (2016)
7. Ito H, Inoue H, Kimura S, Ohmori T, Ishikawa F, Gohda K, Sato J.: Prognostic impact of the number of viable circulating cells with high telomerase activity in gastric cancer patients: a prospective study. *Int J Oncol.* 45(1):227-34. (2014)

8. Ishida K, Hirose T, Yokouchi J, Oki Y, Kusumoto S, Sugiyama T, Ishida H, Shirai T, Nakashima M, Yamaoka T, Ohnishi T, Ohmori T, Kagami Y.: Phase II study of concurrent chemoradiotherapy with carboplatin and vinorelbine for locally advanced non-small-cell lung cancer. *Mol Clin Oncol.* 2(3):405-410 (2014).
9. Hirose T, Murata Y, Oki Y, Sugiyama T, Kusumoto S, Ishida H, Shirai T, Nakashima M, Yamaoka T, Okuda K, Ohnishi T, Ohmori T.: Relationship of circulating tumor cells to the effectiveness of cytotoxic chemotherapy in patients with metastatic non-small-cell lung cancer. *Oncol Res* 20(2-3):131-7. (2012)
10. Okuda K, Hirose T, Oki Y, Murata Y, Kusumoto S, Sugiyama T, Ishida H, Shirai T, Nakashima M, Yamaoka T, Ohnishi T, Ohmori T.: Evaluation of the safety and efficacy of combination chemotherapy with vinorelbine and platinum agents for patients with non-small cell lung cancer with interstitial lung disease. *Anticancer Res* 32(12):5475-80 (2012)
11. Sakai A, Kasahara K, Ohmori T, Kimura H, Sone T, Fujimura M, Nakao S.: MET increases the sensitivity of gefitinib-resistant cells to SN-38, an active metabolite of irinotecan, by up-regulating the topoisomerase I activity. *J Thorac Oncol.* 7(9): 1337-44. (2012)

戦略的研究基盤形成事業

「新たなパラダイムに基づく悪性腫瘍の個別化診断・治療法の研究基盤構築」

研究報告書(2016.9)

外科学講座乳腺外科学部門

はじめに

原発乳がんの治療は、局所療法（手術、放射線治療）による局所コントロールと全身療法（薬物療法）による再発予防で行われている。乳がんは、発症早期でも全身に微小な転移を有している可能性があり、転移による再発は根治の可能性が非常に低く、予後不良である。したがって、転移再発をいかに防ぐかが、乳がんの薬物治療の要である。また、再発乳がんの治療にも薬物療法が重要な役割をしており、薬物療法の進歩に伴いその比重がさらに高まっている。効果的な薬物治療のためには乳がんの生物学的特徴による治療薬の選択がなされており、これが乳がんの個別化治療の核心である。

現在乳がんの薬物療法において3つのバイオマーカーの発現パターンによって、薬剤選択を行っている。その3つのバイオマーカーとは、エストロゲン受容体（ER）、プロゲステロン受容体（PgR）、およびヒトEGF受容体type2（hEGFR2=HER2）である。これまでの研究により、バイオマーカーにより以下のような4つのサブグループに大別でき、その頻度は以下のようになっている。

ER/PgR (+) HER2(-) : ホルモン感受性型	乳がん全体の70-80%
ER/PgR (-) HER2(-) : トリプルネガティブ (TN) 型	10%前後
ER/PgR (+) HER2(+) : トリプルポジティブ (TP) 型	10%前後
ER/PgR (-) HER2(+) : HER2型	10-20%

これらの乳がんのタイプは薬物の感受性に概ね対応しており、ER/PgR (+) は内分泌療法、HER2(+)は抗HER2療法の効果が期待できる。しかし、診療の現場では、薬物療法に難渋することがしばしばある。その理由として、1) 薬剤に対する抵抗性の獲得、2) TN型は標的が不明である、3) 治療中のバイオマーカーの変化、などが挙げられる。特に、2) のTN乳がんに関しては従来の化学療法に治療抵抗性を有するものが存在しており、近年、このTN乳がんは分子腫瘍学的に単一の性質を持つ集団ではなく、いくつかのサブグループに分かれていると報告されている。

また、そのサブグループによる薬剤選択も提唱されており、新たな治療戦略を見出すことが課題となっている。

研究目的

今回、当教室では「乳がんの個別化医療を目指して—特に治療抵抗性乳がんの分子的理解—」を研究テーマとし、特に殺細胞性抗癌剤に対して治療抵抗性を有する割合が高いトリプルネガティブ (TN) 乳がん、さらにこのTN乳がんに関連のある遺伝性乳がんを対象とした研究を行ってきた。また新規タキサン系抗がん剤である nab-Paclitaxel を用いた術前化学療法の臨床試験をもとに、新規分子生物学的手法を用いて治療効果予測因子の探索を行っている。以上の研究をもとに乳がんの

腫瘍生物学的理解を深め、新たな治療法確立を目指している。各項目についての要旨は以下に述べる。

研究結果

1. 遺伝性乳癌と BRCA 遺伝子の変異について

遺伝性乳がんの原因遺伝子としては BRCA 遺伝子の変異が最も多く、約 28% に認められる。くわえて BRCA1 遺伝子変異を持つ乳がん患者においては TN 乳がんが約半数を占めており、BRCA 遺伝子と TN 乳がんは非常に関連が深い。当科ではブレストセンター開設以来、遺伝性乳がんを疑う患者に対して積極的に遺伝カウンセリング、BRCA 遺伝子検査を行っている。2015 年 12 月 31 日までの乳がん発症者における BRCA 遺伝子の変異は、BRCA1 遺伝子変異が 43 人に認められ、BRCA2 遺伝子変異は 28 人に認められた。さらに TN 乳がんに関心を当てると、BRCA1 遺伝子変異を持つ中では TN 乳がんは 28 人に認められ、BRCA2 遺伝子変異では TN 乳がんが 3 人に認められた。以上の結果より BRCA1 変異と TN 乳がんとの関係はこれまでの諸家の報告と同様に非常に高い相関があると考えられた。

2. BRCAness と化学療法の効果について

TN 乳がんの一部は通常使用される殺細胞性抗がん剤に対して感受性が低いことが臨床的に知られているが、その機序に関してはいまだ解明されていない。上述にもあるように TN 乳がんは BRCA1 変異を持つことが多く認められているが、BRCA 遺伝子の germ line mutation を持たない患者でも BRCA 遺伝子の機能不全をきたしていることが知られており、これらの腫瘍は BRCAness を持つ腫瘍とされている。これらは BRCA 遺伝子変異を持つ腫瘍と同様に従来の殺細胞性抗がん剤に対して感受性が低く、アルキル化剤や白金製剤など DNA 直接障害性を持つ抗がん剤、PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) 阻害剤の効果が期待できると報告されている。そこでわれわれは TN 乳がんに対して BRCAness を測定することで、殺細胞性抗がん剤の薬剤選択が治療前に可能となるかを検証する目的に研究を計画・実施してきた。

① BRCAness の測定

1) 対象と方法

対象

- i) 当院で遺伝カウンセリングを行い、BRCA 検査を受け germ line mutation が判明した症例
- ii) 術前化学療法施行例
- iii) 再発後の化学療法として Gemcitabine-Calboplatin 療法を施行した症例

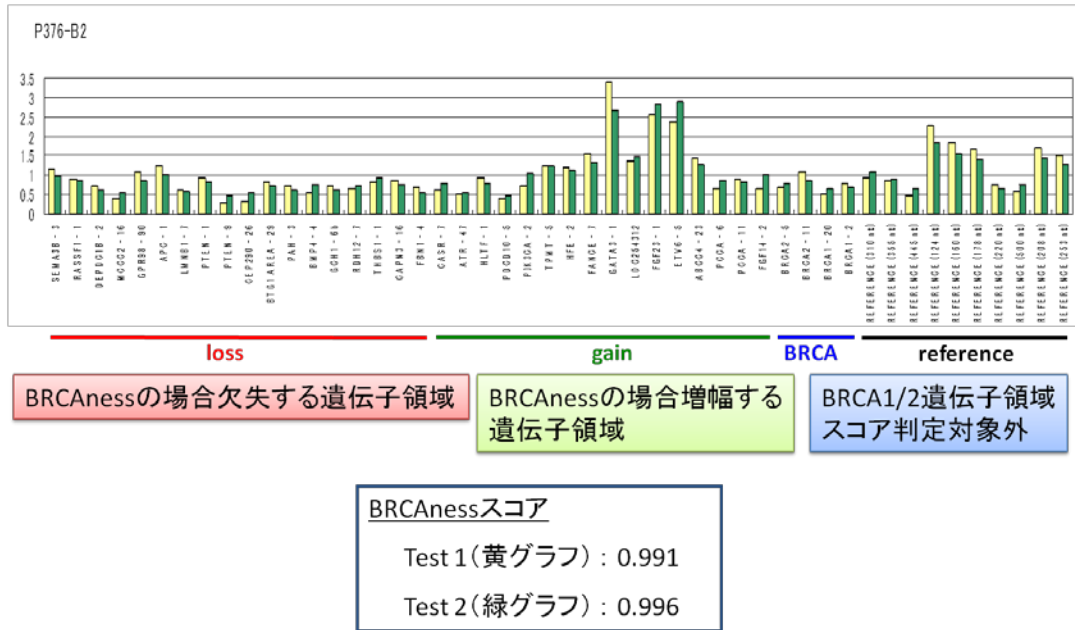
方法

組織標本から癌部を microdissection を行い DNA を抽出、MLPA 法を用いてターゲット領域の遺伝子 copy 数を解析し、PAM で BRCAness をスコア化、cut-off 値を 0.5 として判定した。

また今後の研究の予備的検討事項として、凍結標本とホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本の双方で行い、FFPE 標本でも測定が可能か、また針生検 (CNB) 検体の FFPE 標本を用いた測定が可能であるか、術前化学療法施行後の手術症例でも測定が可能かを検討した。

結果

凍結標本での結果



凍結標本と FFPE 標本の比較

患者バックグラウンド	凍結標本		ホルマリン固定	
	BRCAness スコア (2重測定_平均)	判定結果*	BRCAness スコア	判定結果*
LuminalA	0.118	Sporadic-like	0.123	Sporadic-like
LuminalA	0.032	Sporadic-like	0.037	Sporadic-like
Triple Negative BRCA変異 シークエンス (+)	0.994	BRCA1-like	0.997	BRCA1-like
Triple Negative 50歳以上	0.086	Sporadic-like	0.473	Sporadic-like
LuminalA	0.118	Sporadic-like	0.077	Sporadic-like
Triple Negative BRCA変異 MLPA del_exon20 (+)	0.032	Sporadic-like	0.850	BRCA1-like

BRCA 遺伝子の exon20 の大規模欠損が認められた症例では凍結標本とホルマリン固定で結果が異なったが、そのほかのものでは一致していた。BRCA 遺伝子の大規模欠損の発生頻度は非常に低く、FFPE 標本でも測定が可能と考えられた。この結果より術前化学療法症例に対する研究では FFPE 標本を使用している。

CNB 検体での測定

CNB 検体での測定に関しては、検体そのものの大きさが小さいことより DNA 量の不足が懸念されたが、切片厚を 10 μ m、10 枚使用することで測定に十分な DNA 量を確保できることがわかった。今後 CNB 検体を使用した研究に関しては術前化学療法症例を中心に行っていく予定である。

術前化学療法施行例

術前化学療法施行後の手術症例 50 例に対して測定を行ったところ、6 例 (12%) に BRCAness が認められた。そのうち TN 乳がん 13 例では 5 例 (38%) で BRCAness が認められた。

さらにこの中で術前化学療法に対して抵抗性を示した症例に対して解析を行ったところ、以下のよう
に BRCA 変異陽性 2 例および変異のない 1 例で BRCAness が認められた。

	Germline mutation	BRCA ness	ER	PgR	HER2	Ki67	病理学的効果
Doc1回で PD⇒FEC	BRCA2	陽性	0	0	1	80-90	1a
Doc1回でPD	ND	陽性	0	0	0	60-70	0
nabPTX 7回でPD⇒FEC	BRCA1	陰性	0	0	0	50-60	1b
FEC ⇒Doc3 回PD	ND	陰性	0	0	3	60-70	0

以上の結果より、TN 乳がん と BRCAness は強く相関する可能性があること、さらに BRCAness が化学療法抵抗性の指標になる可能性があることが示唆された。

②化学療法として Gemcitabine-Carboplatin 療法を施行した症例

TN 乳がんなど従来の抗がん剤では高い効果が得られないことがあり、このような腫瘍に対しては白金製剤を用いた治療が高い効果が得られる可能性を持っている。当科で再発乳がんに対する治療として、Gemcitabine-Carboplatin 療法を施行した症例についても同様に BRCAness の測定を行ったところ、3 例に BRCAness を認めた。これら 3 例は臨床経過として従来の化学療法の効果は高くなかったが、Gemcitabine-Carboplatin 療法は従来の化学療法に比して比較的長期間にわたり使用することが可能であった。以上より BRCAness の測定は、白金製剤の効果予測因子としての可能性もあ
ることが示唆された。

3. 新規抗がん剤効果予測因子について

①TN 乳癌のうち病理学的部分奏効であった症例において、化学療法に対する治療効果や治療抵抗性を示す遺伝子変異の同定

新規タキサン系抗がん剤である nab-paclitaxel を用いた術前化学療法の臨床試験を 2011 年 4 月より多施設共同研究として行ってきた。TN 乳癌における nab-paclitaxel による術前化学療法での病理学的完全奏効率は従来のタキサン系抗がん剤 docetaxel と比較してほぼ同等であった。(nab-paclitaxel 群 30% vs. docetaxel 群 28%) 前化学療法を施行した TN 乳癌のうち病理学的部分奏効であった症例において、化学療法に対する治療効果や治療抵抗性を示す遺伝子変異を同定すべく術前・術後の検体を Next Generation Sequence を用いて解析を行った。

【方法】対象は 2011 年から 2014 年に術前化学療法を施行され、手術標本で病理学的完全奏効が確認された TN 症例のうち、自施設で化学療法前針生検を施行されていた 3 症例。針生検のパラフィン標本より DNA を抽出し、TruSight 腫瘍パネル (Illumina 社) を用いて AKT1, ALK, BRAF, EGFR, ERBB2, FGFR2, KIT, MAP2K1, MET, PDGFRA, PIK3CA, SRC, STK11, APC, CDH1, CTNNB1, FBXW7,

Table 3: Specifications

Parameter	Details
Panel Size	21 kb
Content	174 amplicons
Amplicon Size	165–195 bp
DNA input requirement	Based on sample QC (typical range: 30–300 ng)
Library preparation time*	< 7 hours, 2.5 hours hands-on
Sequence run time	22 hours on the MiSeq system; up to 33 hours on the HiSeq 2500 system
Sequence run	2 x 121 bp
Limit of detection	≤ 5% variant allele frequency, reporting limit = 3%
Coverage of each amplicon	Minimum of 1000x coverage, with 7000x mean
Amplicon dropouts	0
Samples per run	4 on the MiSeq system 48 on the HiSeq 2500 system in rapid-run mode
*7-hour assay time with minimum 2-hour hybridization; optional overnight hybridization extends total assay time accordingly.	

FOXL2, GNAQ, GNAS, KRAS, MSH6, NRAS, PTEN, SMAD4, TP53 の 26 遺伝子の 82 エクソン、174 アンプリコンをターゲットとして検索した。

Illumina Trusight Tumor Panel			
kinase		non-kinase	
AKT1	MAP2K1	APC	KRAS
ALK	MET	CDH1	MSH6
BRAF	PDGFRA	CTNNB1	NRAS
EGFR	PIK3CA	FBXW7	PTEN
ERBB2	SRC	FOXL2	SMAD4
FGFR2	STK11	GNAQ	TP53
KIT		GNAS	

【結果】3 症例中、9 種類の遺伝子に変異が検出された。スプライスサイトを除くエクソン部位に認められた変異のうち、アミノ酸の置換を伴わない同義変異を取り除くと、TP53、FOXL2、PIK3CA 遺伝子に変異が検出された。症例 1:TP53、FOXL2、PIK3CA 遺伝子それぞれに 1 つずつ変異が認められた。この症例は BRCA 変異陰性で化学療法前 T1cN0M0StageI、術前化学療法はジェムシタビン+カルボプラチン、FEC を施行されていた。化学療法前針生検の病理学的検索では浸潤性乳管癌 (IDC)、NG3、EGFR<1%、CK5/6 陰性、Ki-67>90%であった。症例 2:TP53 遺伝子に 1 つの変異が認められた。BRCA 変異未測定、化学療法前 T2N2aM0StageIIIA、IDC、NG3、EGFR<5%、CK5/6 90%、Ki67 50-60%であった。症例 3:TP53 遺伝子に 1 つの変異が認められた。BRCA 変異未測定、化学療法前 T2N1M0StageIIB、IDC、EGFR と CK5/6 未測定、Ki67 30-40%であった。TP53 の変異は 3 症例でそれぞれ別の部位での異なる変異であった。3 例全ての症例で現在まで無再発であった。【結論】pCR 症例においても、遺伝子変異が検出された。これらはいずれも多型ではなく、機能に影響を与え得る変異であり、化学療法感受性に寄与している可能性があると考えられた。

No	術前化学療法前 Stage	化学療法	BRCA変異	組織型	NG	Ki-67(%)	EGFR(%)	CK5/6	再発
1	T2N2aM0 StageIIIA	Weekly Paclitaxel/FEC	未測定	Invasive ductal carcinoma	3	50-60	<5	90%	無
2	T2N1M0 StageIIB	Weekly Paclitaxel/FEC	未測定	Invasive ductal carcinoma	3	30-40	未測定	未測定	無
3	T1cN0M0 StageI	Gemcitabine+Carboplatine/FEC	陰性	Invasive ductal carcinoma	3	>90	<1	陰性	無

No.	Gene_0	HGVSc_43 NM_000455 4	HGVSp_44 NP_000446.1	Genoty pe_6	総合判 断	cBioPortal	dbSNP ID_45	Sift_40	PolyPhen_41	Cons erved Sequ ence_57	COSMIC ID_58
1	TP53	c.469G>T	p.Val157Phe	het	damaging	reproted	rs121912654	deleterious(0)	probably_damaging(0.998)		COMS 報告多数
2	TP53	c.422G>A	p.Cys141Tyr	het	damaging	reproted		deleterious(0)	probably_damaging(1)	yes	COMS 報告多数
3	TP53	c.1024C>T	p.Arg342Ter	het	damaging	reported				yes	COSM11073;COSM99721
3	FOXL2	c.389T>A	p.Leu130Gln	het	damaging	Not reported		deleterious(0)	probably_damaging(0.997)	yes	
3	PIK3CA	c.1633G>A	p.Glu545Lys	het	damaging	reported	rs104886003	deleterious(0.01)	possibly_damaging(0.868)	yes	COSM125370;COSM27133;COSM295672;COSM763

②新規抗がん剤 nab-Paclitaxel の効果予測因子の同定

nab-Paclitaxel の特徴としてはヒト血清アルブミンにパクリタキセルを結合させナノ粒子化されていることがあげられる。アルブミンは主として腫瘍から分泌される Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) と結合する。さらに内皮細胞に存在するアルブミン特異的な gp60 受容体に結合し、血管外への運搬に関与する caveolae を活性化する。このことより、nab-paclitaxel の効果予測因子として SPARC、カベオラを形成する分子である caveolin が有用である可能性が示唆される。SPARC は種々の腫瘍細胞で過剰発現しており、とくに乳がんにおいて SPARC 発現陽性例においては予後不良との報告 (Jones, Cancer Res. 2004) がある。また、前述した TN 乳がんにおいても SPARC 遺伝子の発現量が高いと報告 (Charafe-Jauffret, Oncogene 2006) されており、TN 乳がんにおいても重要な役割を果たしている可能性がある。今回、われわれは 2011 年 3 月より 2012 年 1 月まで当院にて術前化学療法を施行した 17 例において caveolin の isoform のひとつである caveolin-1 と SPARC の発現につき免疫染色法を用いて検索を行った。

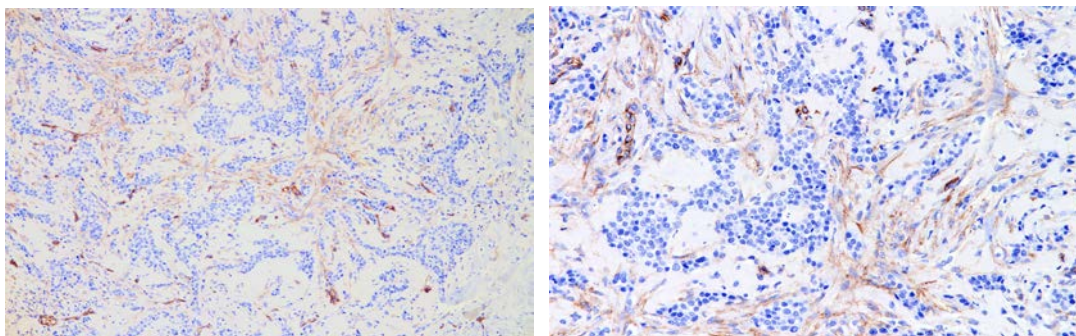
治療レジメン ; nab-Paclitaxel (8 例) / docetaxel (9 例) followed by FEC

方法

caveolin-1 の測定は IHC にて行い、腫瘍細胞および間質細胞の細胞質への染色で陽性判定した。

結果

caveolin-1 陽性例 (IHC)



化学療法前 CNB と caveolin-1 の関係

CNB	Caveolin-1(+)	Caveolin-1(-)	total
ER (+)	1	4	5
Triple negative	1	5	6
total	2	9	11

病理学的完全奏効(pCR)症例における化学療法前 CNB と caveolin-1 の関係

pCR	Caveolin-1(+)	Caveolin-1(-)	total
ER (+)	0	2	2
Triple negative	1	1	2
total	1	3	4

化学療法後残存腫瘍と caveolin-1 の関係

OPE後残存腫瘍	Caveolin-1(+)	Caveolin-1(-)	total
ER (+)	0	5	5
Triple negative	3	3	6
total	3	8	11

今回の研究では pCR 症例において 1 例に caveolin-1 の発現が認められ、化学療法後残存腫瘍において caveolin-1 発現は化学療法前よりやや高い傾向であった。

Caveolin-1 の過剰発現と化学療法耐性との関係については化学療法前の結果に関してはこれまでの報告とは異なっていたが、化学療法後の残存腫瘍ではこれまでの報告のように化学療法耐性との関係がある可能性が示唆された。しかしながら、症例数が少ないため、今後症例の集積を行うことで研究を進める必要があると考えている。

今後の研究方針、今後期待される研究成果

今後の研究方針としては、遺伝性乳癌を疑う患者に関しては、より一層、対象患者の拾い上げをきちんと行い、積極的なカウンセリング等によって症例データの蓄積を行っていくと同時に、BRCAness の測定を行うことで BRCA 遺伝子の germline mutation の有無にかかわらず、従来の殺細胞性化学療法剤の効果予測が可能になると期待され、TN 乳癌における個別化医療が可能になることが期待できる。また、術前化学療法の効果予測因子、特に nab-Paclitaxel の効果予測因子の同定に向けた研究を引き続き行っていく予定である。

研究業績

1. 論文

①Rena SHIGENAGA, Sadako AKASHI-TANAKA, Satoko UCHIDA, Murasaki IKEDA, Hiroto OYAMA, Reiko YOSHIDA, Kenya SUZUKI, Katsutoshi ENOKIDO, Terumasa SAWADA, Junko YOTSUMOTO, Seigo NAKAMURA

BRCA1/2 mutation frequency is high in Japanese triple negative breast cancer patients.
The Showa university journal of medical science 26 2014

①Sadako Akashi-Tanaka, Chie Watanabe, Tomoko Takamaru, Takashi Kuwayama, Murasaki Ikeda, Hiroto Ohyama, Miki Mori, Reiko Yoshida, Rikako Hashimoto, Sawada Terumasa, Katsutoshi Enokido, Yuko Hirota, Hiromi Okuyama, Seigo Nakamura

BRCAness predicts resistance to taxane-containing regimens in triple negative breast cancer during neoadjuvant chemotherapy.

Clinical Breast Cancer 2015.2

非小細胞肺癌患者に対する上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害薬エルロチニブおよびゲフィチニブによる間質性肺炎と薬物動態

医学部内科学講座腫瘍内科学部門 佐々木康綱

目的

エルロチニブとゲフィチニブは上皮成長因子受容体(EGFR)のチロシンキナーゼを可逆的に阻害するチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)である。これらの TKI は転移・再発非小細胞がんの治療に用いられる。これらの TKI による治療では、皮疹や下痢が高頻度に認められる(1)。また、頻度は低いが重篤かつ時として致死的な間質性肺炎が惹起される(1)。エルロチニブやゲフィチニブの体内動態には大きな個体差が認められる。そこで、薬物動態の差異が毒性と相関する可能性を考えた。本研究ではまず、エルロチニブおよびゲフィチニブのにより惹起される間質性肺炎と、これら TKI の薬物体内動態との関係を調査した。エルロチニブとゲフィチニブは肝細胞の胆管膜側および小腸粘膜の管腔側膜に発現する薬物輸送担体である、*ABCG2* の基質であることが知られている。*ABCG2* 遺伝子には、蛋白の発現量低下を引き起こす多型である 421C>A が存在が報告されている。本多型によりエルロチニブおよびゲフィチニブの血中濃度推移が上昇したとの報告があり(1)、本研究では本多型とエルロチニブおよびゲフィチニブによる間質性肺炎、および体内動態の関係についても調べた。

方法

エルロチニブ(150 mg/body/day)とゲフィチニブ(250 mg/body/day)にて治療した転移・再発非小細胞肺癌患者における間質性肺炎、薬物体内動態、および *ABCG2* の遺伝子多型 421C>A について前向きに調査した。本臨床研究は、予め昭和大学の倫理委員会の承認を受けた。本研究にエントリーした患者からは文書にて同意をし得た。毒性は **Common Terminology Criteria for Adverse Events (version. 4.0)**にて評価した。エルロチニブの薬物体内動態解析用

の血液は、投与初日の投与前、投与後 1, 2, 4, 8 および 24 時間後、および投与後 8 日目の投与前に採取した。ゲフィチニブの場合は、投与初日の投与前、1, 3, 5, 8 および 24 時間後、および投与後 8 日目と 15 日目の投与前に採取した。遠心分離により血液から血漿を得て光速液体クロマトグラフィー(HPLC)による血漿中濃度の測定に供した。採取した全血からゲノム DNA を調製し、ダイレクトシーケンス方により *ABCG2* 421C>A の遺伝子型を解析した。

結果

エルロチニブを投与した 25 名の非小細胞肺癌患者(男性 18 名と女性 7 名, 年齢中央値 68 才 [範囲 31-82 才])(2), およびゲフィチニブを投与した 35 名の非小細胞肺癌患者(男性 14 名と女性 21 名, 年齢中央値 72 才 [範囲 53-90 才])(3)が本研究にエントリーし、これらの患者についてエルロチニブまたはゲフィチニブの毒性、薬物動態および *ABCG2* 421C>A について調べた。

エルロチニブを投与した 25 名の患者の中で 3 名が、投与開始の 8 日以内に重篤な間質性肺炎 (≥ グレード 4) を発症した。73 才の男性患者(患者 A)においては、投与 7 日後に致死的な間質性肺炎が発症した。間質性肺炎発症後、直ちにエルロチニブによる治療を中止し、ステロイドのパルス療法を施行したが、間質性肺炎の症状は改善せず、患者は急性増悪により数日後に死亡した。また、78 才と 80 才の女性患者 (患者 B および C) は、それぞれエルロチニブの投与開始後 7 日目および 8 日目にグレード 4 の間質性肺炎を発症した。

エルロチニブを投与した患者における投与初日の血漿中濃度推移を図 1 に示す。投与開始から 24 時間後までの血漿中薬物濃度-時間曲線下面積(AUC)の中央値は、69.1 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ であった (範囲, 35.5-123 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$)。患者 A と B は最も高い AUC(123 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$) および 3 番目に高い AUC(112 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$) を示した。一方、患者 C は最も低い AUC(35.5 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$) を示した。しかしながら、本患者血漿中濃度は投与開始以降持続的に上昇し、24 時間後に最高値を示した(図 1 の点線)。この特異な体内動態はエルロチニブの蓄積を惹起し、エルロチニブの投与開始後 8 日の

トラフ血漿中濃度は、調査した 21 名の患者の中で(中央値 5.84 μM , [範囲, 3.51-8.33 μM]), 3 番目に高かった(8.20 μM). 患者 A と B においてはそれぞれ 7 日ごと 8 日後に間質性肺炎を発症したため、エルロチニブの投与開始後 8 日のトラフ血漿中濃度は測定できなかった. 患者 A は ABCG2 421C>A のホモ接合体であった. 本患者においては, ABCG2 によるエルロチニブの胆汁排泄が低下したために血漿中濃度が上昇し, 間質性肺炎の惹起に繋がったと考えられた. ゲフィチニブを投与した 35 名の患者の中で 1 名が重篤な間質性肺炎(\geq グレード 4)を発症した. 本患者におけるゲフィチニブの AUC は最も高く, 投与開始後 8 日目のトラフ血漿中濃度は 2 番目に高かった. 本患者における ABCG2 の遺伝子型は野生型であった.

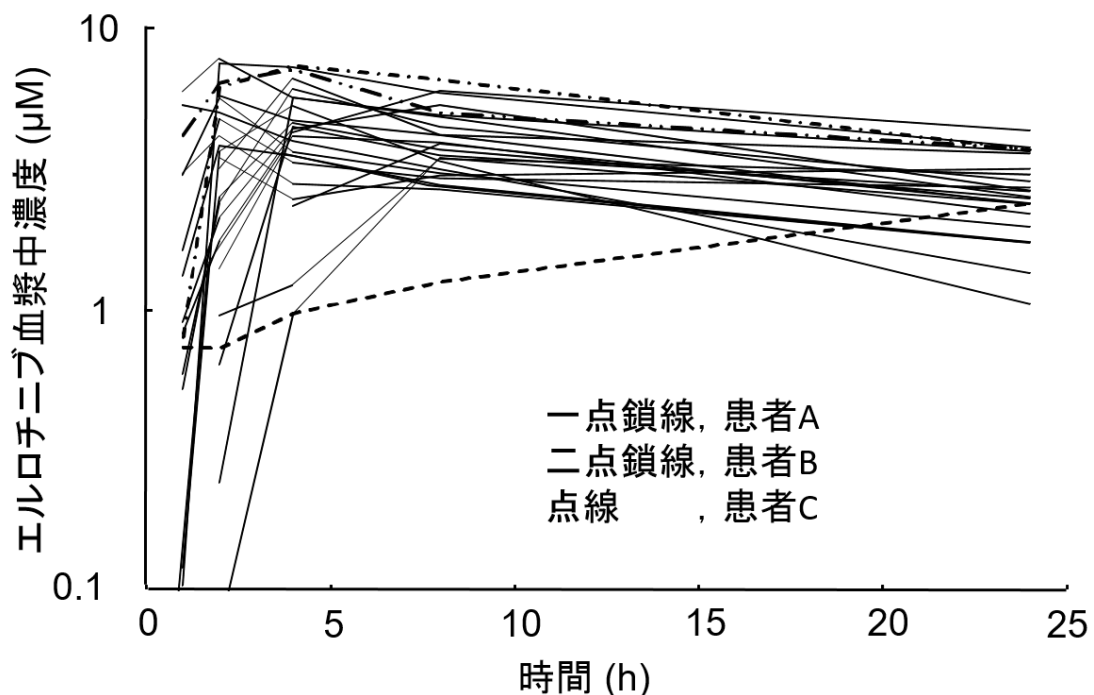


図1. 25名の患者におけるエルロチニブ投与初日の血漿中濃度推移 ま
 とめ

以上の結果は, エルロチニブおよびゲフィチニブによる重篤な間質性肺炎は, これらの TKI による暴露量が高い場合に起こりやすい可能性を示唆する. また, エルロチニブを投与した患者 A の結果は, 間質性肺炎と ABCG2 421C>A との関係を示唆する. 結論を導くためにはさら

に患者数を増やした検討が必要である.

参考文献

1. Fujita K, Ishida H, Kubota Y, Sasaki Y Toxicities of Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Pharmacotherapy: Management with Clinical Pharmacology. *Curr Drug Metab* 2017;18:186-198.
2. Fujita K, Hirose T, Kusumoto S, Sugiyama T, Shirai T, Nakashima M, Akiyama Y, Sasaki Y. High exposure to erlotinib and severe drug-induced interstitial lung disease in patients with non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2014;86:113-114.
3. Hirose T, Fujita K, Kusumoto S, Oki Y, Murata Y, Sugiyama T, Ishida H, Shirai T, Nakashima M, Yamaoka T, Okuda K, Ohmori T, Sasaki Y. Association of pharmacokinetics and pharmacogenomics with safety and efficacy of gefitinib in patients with EGFR mutation positive advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2016;93:69-76.

概要

口腔癌は全癌腫の約 4%に過ぎず、絶対的発生率および患者数は多くはない。しかしながら、食べる、話す、呼吸するといった人としての根源的機能を有する口腔機能を癌腫の発生進展、もしくは加療によって形態的・機能的消失することは人間としての尊厳を大きく損なう可能性がある。このため口腔癌の早期発見および有効な加療体系の開発は喫緊の課題であり、国民の福利に適う。

近年、口腔癌に最も多いとされる扁平上皮癌の悪性化に関与する遺伝子制御機構の解明が進み、その遺伝子産物を標的とした分子標的治療の可能性が模索されている。しかしながら、既存の分子標的治療が必ずしも満足のゆく治療成績を挙げているとは言い難い。この点に鑑みて本研究では

- ① 口腔扁平上皮癌におけるエピジェネティック修飾
- ② microRNA の網羅的解析による早期診断法の開発を行った。

1. 現在までの進捗状況

① DNA のメチル化に代表されるエピジェネティックな制御機構は、発生、分化、老化の調節、染色体の構造の安定化、遺伝子量の補償など生命現象に深く関与している。口腔癌の癌化の過程において特定の遺伝子のメチル化の異常の報告はなされているが、網羅的なメチル化の異常についての詳細な報告は少ない。このため本研究では、口腔扁平上皮癌における網羅的メチル化プロファイルを検討した。

【方法】解析方法は、Infinium HumanMethylation27 BeadArray system (Illumina)を用いた。解析対象として、口腔扁平上皮癌細胞株(3 株)および臨床検体の口腔扁平上皮癌組織(59 例)、口腔正常粘膜上皮(3 例)、頬粘膜 Swab(6 例)を用いた。

【結果】Infinium HumanMethylation27 BeadArray system を用いて個々の解析症例のメチル化プロファイルを同定することが出来た。階層的クラスター解析の結果、約 2000 遺伝子においてメチル化プロファイルを行った所、大きく 2 群に分類された。一方は、正常組織と比較してメチル化の変化の少ない癌症例が含まれており(ClusterA)、もう一方のグループは正常組織と比較してメチル化の異常が多く蓄積していた(ClusterB)。ClusterB 群において高度にメチル化される遺伝子としては、CDH2, MLH1 などの既知の浸潤転移や血管新生に関与する因子が含まれていた。メチル化プロファイルと臨床病理学的情報との相関について統計学的に検討を行ったところ、ClusterB には頸部リンパ節転移を伴う症例、病期分類では高度進行症例、組織学的には低分化癌が多く含まれていた。さらにこの 2 群間の予後について Kaplan Myer 法を用いて解析を行ったところ、ClusterB に分類される症例は有意な差をもって予後不良であることが判明した。以上の結果より、口腔扁平上皮癌はメチル化プロファイルによって 2 群に分類出来る

ことが明らかとなった。また、我々は口腔癌の予後マーカーとなり得る候補遺伝子群、EPHA5, CYB5R1 を抽出した。

② microRNA (miRNA) は DNA より転写されるがタンパク質へ翻訳されない non-codingRNA の一種であり標的遺伝子の翻訳抑制及び分解といった遺伝子発現制御機構に関与し、細胞の増殖・分化をはじめとして様々な生命現象を制御していると考えられている。癌の発生過程においても miRNA の発現異常に起因する遺伝子発現制御機構の破綻が生じているとの報告があるが、口腔癌の癌化における miRNA の役割は明らかとなっていない。本研究は、口腔癌における miRNA の網羅的発現解析を行い、扁平上皮細胞の悪性化に関与する miRNA を同定する事を目的とした。

【方法】解析方法は 384 種類の miRNA が解析可能な ABI 社の TaqMan Low Density Array を用いた。解析対象として口腔扁平上皮癌細胞株(3 株)、口腔正常上皮細胞株(1 株)、口腔癌組織(29 症例)、口腔正常粘膜上皮(3 例)のそれぞれから抽出された Total RNA を用いた。

【結果】細胞株からの miRNA の発現プロファイルは臨床検体からは特異的高発現する miRNA を 72 個、逆に発現が減弱する miRNA を 31 個同定した。その中で癌組織において高発現していたものは miR-221, miR203, miR429 であった。さらに転移を認めた臨床検体で高発現していたのは miR-20a, miR-18a, miR-429 であった。この新規に見いだされた miRNA 群は扁平上皮細胞の発癌や悪性化に重要な役割を果たしている可能性がある。現在、これら同定された数種類の miRNA について各 miRNA を癌細胞株へ遺伝子導入し、癌細胞株の細胞増殖能、細胞遊走能等の変化を解析している段階である。

2. 特に優れた研究成果

①口腔扁平上皮癌はメチル化プロファイルによって ClusterA、ClusterB の 2 群に分類出来ることが明らかとなった。特に ClusterB は臨床病理学的悪性度や生存率に相関する結果となった。

②正常粘膜上皮に比較して扁平上皮癌で発現の高いものや低いものの具体的な miRNA が判明した。中でも高発現している miRNA は miR-221, -203, -429 であった。

3. 問題点と克服方法

①口腔扁平上皮癌組織からの DNA 抽出が難しく、上皮組織からなる腫瘍実質以外の腫瘍間質の混在が多くなる傾向があった。そのため、腫瘍実質からの DNA 採取を行うためレーザーマイクロダイセクションを用いて腫瘍実質からの DNA 量を得る試みを行った。

②同定された miRNA が悪性度にどのような関与をしているかを個別に検討するため、まずは細胞株での増殖、遊走能の検討を行った。しかしながら、再現性に問題が生じており、最適な条件設定を検討している。

4. 研究成果の副次的効果

①異常メチル化候補遺伝子以外にも口腔癌の癌化に寄与する可能性のある候補遺伝子、EPHA5, CYB5R1 を抽出した。

5. 今後の研究方針、今後期待される研究成果

①口腔癌における EPHA5、CYB5R1 発現意義を分子生物学的手法を用いて検証することにより、口腔癌患者の新たな治療標的の候補、腫瘍マーカーとなり得る可能性がある。

②miRNA Transfection による実験で細胞増殖能、細胞遊走能を解析することで新たな標的分子の同定が可能になるかもしれない。

1. Motohashi H, Mukudai Y, Ito C, Kato K, Shimane T, Kondo S, Shirota T: Tumor protein D52 expression is post-transcriptionally regulated by intercellular antigen (TIA) 1 and TIA-related protein via mRNA stability. *Biochemical J* 474: 1669-1687, 2017.

2. Kato K, Mukudai Y, Motohashi H, Ito C, Kamoshida S, Shimane T, Kondo S, Shirota T: Opposite effects of tumor protein D (TPD) 52 and TPD-54 on oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 50: 1634-1646, 2017.

3. Mukudai Y, Zhang M, Shiogama S, Kondo S, Ito C, Motohashi H, Kato K, Fujii M, Shintani S, Shigemori H, Yazawa K and Shirota T: Methanol and butanol extracts of paeonia lutea leaves repress metastasis of squamous cell carcinoma. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016; Volume 2016; Article ID 6087213.

4. Nagasaki M, Kondo S, Mukudai S, Kamatani T, Akizuki A, Yaso A, Shimane T and Shirota T. Clinicopathological implications of vascular endothelial growth factor 165b expression in oral squamous cell carcinoma stroma. *Oncol Rep*, 36:573-81, 2016.

5. Kondo S, Mukudai Y, Soga D, Nishida T, Takigawa M, Shirota T.: Differential expression of vascular endothelial growth factor in high- and low-metastasis cell lines of salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Anticancer Research* 34:671-7, 2014.

6. *¹Soga D, Yoshida S, Shiogama S, Miyazaki H, Kondo S, Shintani S.: microRNA expression profiles in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 30:579-83, 2013

培養ヒトグリオーマ細胞における PACAP および PACAP 受容体の発現と癌幹細胞マーカーとの相関性

大滝博和¹、中町智哉^{1,2,3}、渡邊 潤^{1,2}、荒田 悟²、塩田清二⁴、本田一穂¹

1 昭和大学医学部解剖学講座顕微解剖学教室

2 昭和大学遺伝子組み換え実験室

3 富山大学大学院理工学研究部 (理学)

4 星薬科大学先端生命科学研究所 生命科学先導研究センター ペプチド創薬研究室

下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)は、1989年宮田らによってヒツジの視床下部から単離・同定された神経ペプチドであり、38アミノ酸残基からなる PACAP38 とその N 末の 27 アミノ酸残基からなる PACAP27 の 2 つのフォームが存在する。PACAP の受容体は 3 種見出されており PACAP と相関性の高い VIP と同等の親和性で結合する VPAC 受容体 (VPAC1R、VPAC2R) と、PACAP が VIP に対し高い親和性を有する PAC1 受容体 (PAC1R) が存在する。これまで PACAP はこれらの受容体と結合して神経保護作用、抗炎症作用および血管、気管支の拡張作用が報告されている。これらに加え、PACAP およびその受容体は発生期の初期から遺伝子が発現していることも見出されており、細胞の増殖や分化に対して役割を有することが報告されている。

グリオーマは中枢神経系で神経細胞を支持するグリア細胞が腫瘍化したものである。主なグリオーマとして星細胞腫(アストロサイトマ)があり、原発性脳腫瘍のおよそ 8%、全グリオーマの約 30% を占めている。生存期間は中央値 7-8 年、5 年生存率 50-70% でありもともと悪性度の高い腫瘍であるが、悪性転化して膠芽腫 (グリアブラストマ) となると生存期間中央値は約 1 年程度、2 年生存率 30% 以下、5 年生存率 8% 以下という最も悪性度が高い腫瘍のひとつとなる。このように星細胞腫の早期診断は脳腫瘍治療における重要な課題である。本研究室はこれまで神経幹/前駆細胞やアストロサイト初代培養細胞へ PACAP 添加により細胞増殖が促進することを明らかにした。しかし、PACAP のグリオーマへの影響は不明である。そこで本研究は、グリオーマの PACAP とその受容体の発現量を調べるとともにグリオーマの細胞増に及ぼす影響を調べた。そして早期発見のためのマーカーとして診断に応用できないか検討する。

【結果および考察】

・ PACAP 及び PACAP 受容体の発現量の比較

PACAP、PAC1R、VPAC1R mRNA は全てのグリオーマ細胞で発現が認められた。しかし VPAC2R mRNA は検出されなかった。PACAP mRNA は全体的に発現しており、発現量の高い順に KINGS-1、SF-126、YH-13、KNS-81 であった。PAC1R mRNA は KINGS-1、YH-13 で多く発現しており、KNS-81 はそのおよそ 1/4、YH-13 はそのおよそ 1/2 程度であった。VPAC1R mRNA は YH-13 で特に多く発現していた。

・ 癌細胞表面抗原の発現量の比較

悪性度の異なるヒトグリオーマ細胞 (SF-126、YH-13、KINGS-1、KNS-81) における PACAP 及び PACAP 受容体の発現量と、PACAP による増殖促進効果を比較・検討した。グリオーマ細胞において CD44 は癌転移能の指標としてよく用いられている。一方、CD90、CD133 は癌幹細胞マーカーとして知られており、グリオーマ細胞においては悪性度の指標となる。CD44、90、

133 mRNA の発現量を比較したところ、KNS-81 はどれも発現量が多く、逆に YH-13 は全て発現量が他と比較して少なかった。これらの結果より、今回用いた4種のグリオーマ細胞の中で KNS-81 が最も悪性度が高く、YH-13 は最も悪性度が低いと考えられた。

PACAP 及び PACAP 受容体 mRNA 発現量においては、PACAP、PAC1R、VPAC1R mRNA は全てのグリオーマ細胞で発現が認められたが、特に PAC1R、VPAC1R mRNA は悪性度の低いグリオーマ細胞(YH-13,SF-126)に多く発現している傾向があった。

・グリオーマ細胞の細胞増殖に対する PACAP の作用

PACAP 投与により SF-126、KINGS-1、KNS-81 細胞に対してはその細胞増殖に有意な影響は見られなかったが、YH-13 細胞に対しては 10^{-11} M の濃度で投与したときに約 40%の顕著な細胞増殖促進作用が見られた。

以上の結果から、PACAP 受容体の発現量が癌細胞の悪性度と相関性があることが示された。また PACAP 投与によって YH-13 細胞のみの増殖が促進されたことから、PACAP がとくに悪性度の低い段階のグリオーマの増殖に深く関与していることが明らかとなった。

・PACAP の末梢神経の投射による末梢臓器支配と腫瘍への関連性

近年、PACAP は末梢神経にも発現していることが指摘され、免疫応答などに対し末梢神経の神経投射により働いていることが明らかとなってきた。我々は近年、骨髄造血細胞に PAC1R の発現が認められることを見出している。FACS および組織染色による詳細な検討は PAC1R が造血細胞の中でも未熟な細胞に強く発現していることを明らかにし、造血器官における階層性依存性を見出した。さらに、CD34/Sca-1 陽性培養細胞に対し PACAP を加えたところ cyclin D1 の遺伝子発現および細胞の増殖が促され、PAC1R のアンタゴニストで阻害されることを見出した。加えて、骨髄への神経逆行性トレーサーを投与し、脛骨に投射する神経節の交感神経細胞に PACAP が強く発現していることを明らかにした。さらに、PACAP の末梢神経を介した末梢臓器の制御は外分泌腺においても証明された。PACAP が外分泌腺への神経投射により涙や、汗などの腺分泌に関与することを見出した。腫瘍の増殖や転移に関して末梢神経の神経投射による制御が着目されている。そこで、ヌードマウスにヒト肺癌基底上皮腺癌細胞である A549 細胞を移植し腫瘍もしくはその間質細胞に投射している末梢神経系を同定した。腫瘍の中心部は神経線維 (neurofilament により同定) や交感神経系 (Tyrosine hydroxylase により同定) のマーカーでほとんど染色されないが、腫瘍周囲 (辺縁) 部には多くの陽性反応が認められた。現在、PACAP がこれら神経線維に存在しているか、またどの細胞に PACAP レセプターが発現しているか詳細に検討している。さらに PACAP 遺伝子欠損マウスを用いて腫瘍を移植したときの増殖や転移などを検討していく予定である。

原著論文

1. Miyamoto K, Tsumuraya T, Ohtaki H, Dohi K, Satoh K, Xu Z, Tanaka S, Murai N, Watanabe J, Sugiyama K, Aruga T, Shioda S. PACAP38 suppresses cortical damage in mice with traumatic brain injury by enhancing antioxidant activity. *J Mol Neurosci.* 2014;54:370-9.
2. Tsuchida M, Nakamachi T, Sugiyama K, Tsuchikawa D, Watanabe J, Hori M, Yoshikawa A, Imai N, Kagami N, Matkovits A, Atsumi T, Shioda S. PACAP stimulates functional recovery after spinal cord injury through axonal regeneration. *J Mol Neurosci.* 2014 54:380-7.

3. Nakamachi T, Sugiyama K, Watanabe J, Imai N, Kagami N, Hori M, Arata S, Shioda S. Comparison of expression and proliferative effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptors on human astrocytoma cell lines. *J Mol Neurosci.* 2014;54:388-94.
4. Nakamura K, Nakamachi T, Endo K, Ito K, Machida T, Oka T, Hori M, Ishizaka K, Shioda S. Distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the human testis and in testicular germ cell tumors. *Andrologia.* 2014;46:465-71.
5. Xu Z, Ohtaki H, Watanabe J, Miyamoto K, Murai N, Sasaki S, Matsumoto M, Hashimoto H, Hiraizumi Y, Numazawa S, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) contributes to the proliferation of hematopoietic progenitor cells in murine bone marrow via PACAP-specific receptor. *Sci Rep.* 2016 6:22373.
6. Nakamachi T, Ohtaki H, Seki T, Yofu S, Kagami N, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Mark L, Lanekoff I, Kiss P, Farkas J, Reglodi D, Shioda S. PACAP suppresses dry eye signs by stimulating tear secretion. *Nat Commun.* 2016 7:12034.
7. Matoba Y, Nonaka N, Takagi Y, Imamura E, Narukawa M, Nakamachi T, Shioda S, Banks WA, Nakamura M. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhances saliva secretion via direct binding to PACAP receptors of major salivary glands in mice. *Anat Rec (Hoboken).* 2016 299:1293-9.
8. Sasaki S, Watanabe J, Ohtaki H, Matsumoto M, Murai N, Nakamachi T, Hannibal J, Fahrenkrug J, Hashimoto H, Watanabe H, Sueki H, Honda K, Miyazaki A, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes eccrine gland sweat secretion. *Br J Dermatol.* 2016 Jul 25. doi: 10.1111/bjd.14885. [in press]

研究発表の状況

柴沼 質子

1. *²Linkage of E2F1 transcriptional network and cell proliferation with respiratory chain activity in breast cancer cells.
K. Mori, T. Uchida, M. Fukumura, S. Tamiya, M. Higurashi, H. Sakai, F. Ishikawa and M. Shibnuma
(Cancer Sci., 107: 963-971. 2016)
2. Loss of anchorage primarily induces non-apoptotic cell death in a human mammary epithelial cell line under atypical focal adhesion kinase signaling.
F. Ishikawa, K. Ushida, K. Mori, and M. Shibnuma
(Cell Death & Dis. Jan 22;6:e1619. 2015)
3. A mitochondrial thioredoxin-sensitive mechanism regulates TGF- β -mediated gene expression associated with epithelial-mesenchymal transition.
F. Ishikawa, E. Kaneko, T. Sugimoto, T. Ishijima, M. Wakamatsu, A. Yuasa, R. Sampei, K. Mori, K. Nose, and M. Shibnuma
(Biochem. Biophys. Res. Commun. 443: 821-827. 2014)
4. A HIC-5- and KLF4-dependent mechanism transactivates p21Cip1 in response to anchorage loss.
Mori, K., Hamanaka, H., Oshima, Y., Araki, Y., Ishikawa, F., Nose, K. and Shibnuma, M.
(J. Biol.Chem., 287:38854-38865. 2012)
5. *¹Critical roles of the cAMP-responsive element-binding protein-mediated pathway in disorganized epithelial phenotypes caused by mitochondrial dysfunction.
Shibnuma, M., Ishikawa, F., Kobayashi, M., Katayama, K., Miyoshi, H., Wakamatsu, M., Mori, K., and Nose, K.
(Cancer Sci., 103:1803-1810. 2012)

宮崎 章

6. Terasaki M, Nagashima M, Watanabe T, Miyazaki A, Hirano T. Effects of PKF275-055, a dipeptidyl peptidase-4, on the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-null mice. Metabolism 2012;61(7):974-977.
7. Koya T, Miyazaki T, Watanabe T, Shichiri M, Atsumi T, Kim-Kaneyama JR,

- Miyazaki A. Salusin- β accelerates inflammatory responses in vascular endothelial cells via NF- κ B signaling in LDL receptor-deficient mice in vivo and HUVECs in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;303(1):H96-H105.
8. *¹Kim-Kaneyama JR, Miyauchi A, Lei XF, Arita S, Mino T, Takeda N, Kou K, Eto K, Yoshida T, Miyazaki T, Shioda S, Miyazaki A. Identification of Hic-5 as a novel regulatory factor for integrin α IIb β 3 activation and platelet aggregation in mice. *J Thromb Haemostat*. 2012;10(9):1867-1874.
 9. Masunaga A, Nagashio R, Iwamoto S, Takeyama N, Sato Y, Miyazaki A, Mitsuya T. A case of pulmonary papillary adenoma: possible relationship between tumor histogenesis/tumorigenesis and fibroblast growth factor 2 IIIb. *Pathol Int*. 2012;62(9):640-645.
 10. Kamiyama T, Watanabe H, Iijima M, Miyazaki A, Iwamoto S. Coexpression of CCR6 and CD146 (MCAM) is a marker of effector memory T-helper 17 cells. *J Dermatol*. 2012;39(10):838-842.
 11. Sasabe N, Keyamura Y, Obama T, Inoue N, Masuko Y, Igarashi Y, Aiuchi T, Kato R, Yamaguchi T, Kuwata H, Iwamoto S, Miyazaki A, Hara S, Yoshikawa T, Itabe H. Time course-changes in phosphatidylcholine profile during oxidative modification of low-density lipoprotein. *Lipids Health Dis* 2014 Mar 14;13:48. doi: 10.1186/1476-511X-13-48.
 12. Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Arita-Okubo S, Offermanns S, Itabe H, Miyazaki T, Miyazaki A. Identification of hydrogen peroxide-inducible clone 5 as a novel scaffold for the mitogen-activated protein kinase kinase 4/p54 c-Jun N-terminal kinase pathway in the development of abdominal aortic aneurysms. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(3):e000747.
 13. Kigawa Y, Miyazaki T, Lei XF, Nakamachi T, Oguchi T, Kim-Kaneyama JR, Taniyama M, Tsunawaki S, Shioda S, Miyazaki A. NADPH oxidase deficiency exacerbates angiotensin II-Induced abdominal aortic aneurysms in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(11):2413-2420.
 14. Arita-Okubo S, Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Fu WG, Ohnishi K, Takeya M, Miyauchi A, Honda H, Itabe H, Miyazaki T, Miyazaki A. Role of Hic-5 in the formation of microvilli-like structures and the monocyte endothelial interaction that accelerates atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2015;105(3):361-371.
 15. Miyazaki T, Taketomi Y, Saito Y, Hosono T, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Arata S, Takahashi H, Murakami M, Miyazaki A. Calpastatin counteracts pathological angiogenesis by inhibiting suppressor of cytokine signaling 3 degradation in vascular endothelial cells. *Circ Res*. 2015;116(7):1170-1181.

16. Jamba A, Kondo S, Urushihara M, Nagai T, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A, Kagami S. Hydrogen peroxide-inducible clone-5 regulates mesangial cell proliferation in proliferative glomerulonephritis in mice. *PLoS One* 2015;10(4):e0122773
17. Furukawa M, Kim-Kaneyama JR, Yamada M, Senda A, Manabe A, Miyazaki A. Cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human gingival fibroblasts in vitro. *Oper Dent*. 2015;40-4:430-439.
18. *2Lei XF, Fu W, Kim-Kaneyama JR, Omoto T, Miyazaki T, Li B, Miyazaki A. Hic-5 deficiency attenuates the activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis through upregulation of Smad7 in mice. *J Hepatol*. 2016;64(1):110-117.
19. Sato C, Iso Y, Mizukami T, Otabe K, Sasai M, Kurata M, Sanbe T, Sekiya I, Miyazaki A, Suzuki H. Fibroblast growth factor-23 induces cellular senescence in human mesenchymal stem cells from skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;470(3):657-662.
20. Matsumoto M, Nakamachi T, Watanabe J, Sugiyama K, Ohtaki H, Murai N, Sasaki S, Xu Z, Hashimoto H, Seki T, Miyazaki A, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is involved in adult mouse hippocampal neurogenesis after stroke. *J Mol Neurosci*. 2016;59(2):270-279
21. Miyazaki T, Tonami K, Hata S, Aiuchi T, Ohnishi K, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Takeya M, Itabe H, Sorimachi H, Kurihara H, Miyazaki A. Calpain-6 confers atherogenicity to macrophages by dysregulating pre-mRNA splicing. *J Clin Invest*. 2016 in press
22. Sasaki S, Watanabe J, Ohtaki H, Matsumoto M, Mukai N, Nakamachi T, Hannibal J, Fahrenkrug J, Hashimoto H, Watanabe H, Sueki H, Honda K, Miyazaki A, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes eccrine gland sweat secretion. *Br J Dermatol*. 2016 in press.

大森 亨

1. Yamaoka T, Ohmori T, Ohba M, Arata S, Murata Y, Kusumoto S, Ando K, Ishida H, Ohnishi T, Sasaki Y. Distinct Afatinib Resistance Mechanisms Identified in Lung Adenocarcinoma Harboring an EGFR Mutation. *Mol Cancer Res*. 2017, in press.
2. Yamaoka T, Ohmori T, Ohba M, Arata S, Kishino Y, Murata Y, Kusumoto S, Ishida H, Shirai T, Hirose T, Ohnishi T, Sasaki Y. Acquired Resistance Mechanisms to Combination Met-TKI/EGFR-TKI Exposure in Met-Amplified EGFR-TKI-

- Resistant Lung Adenocarcinoma Harboring an Activating EGFR Mutation. *Mol Cancer Ther.* 15(12):3040-3054 (2016)
3. Hirose T, Fujita K, Kusumoto S, Oki Y, Murata Y, Sugiyama T, Ishida H, Shirai T, Nakashima M, Yamaoka T, Okuda K, Ohmori T, Sasaki Y.: Association of pharmacokinetics and pharmacogenomics with safety and efficacy of gefitinib in patients with EGFR mutation positive advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 93:69-76. (2016)
 4. Ito H, Sato J, Tsujino Y, Yamaguchi N, Kimura S, Gohda K, Ito S, Murakami K, Onimaru M, Ohmori T, Ishikawa F, Inoue H.: Long-term prognostic impact of circulating tumour cells in gastric cancer patients. *World Journal of Gastroenterology.* (2016) in printing
 5. Ito H, Yamaguchi N, Onimaru M, Kimura S, Ohmori T, Ishikawa F, Sato J, Ito S, Inoue H.: Change in number and size of circulating tumor cells with high telomerase activity during treatment of patients with gastric cancer. *Onco Lett 電子版* (2016)
 6. Toba-Ichihashi Y, Yamaoka T, Ohmori T, Ohba M.: Up-regulation of Syndecan-4 contributes to TGF- β 1-induced epithelial to mesenchymal transition in lung adenocarcinoma A549 cells. *Biochem Biophys Res* 5, 1-7 (2016)
 7. Ito H, Inoue H, Kimura S, Ohmori T, Ishikawa F, Gohda K, Sato J.: Prognostic impact of the number of viable circulating cells with high telomerase activity in gastric cancer patients: a prospective study. *Int J Oncol.* 45(1):227-34. (2014)
 8. Ishida K, Hirose T, Yokouchi J, Oki Y, Kusumoto S, Sugiyama T, Ishida H, Shirai T, Nakashima M, Yamaoka T, Ohnishi T, Ohmori T, Kagami Y.: Phase II study of concurrent chemoradiotherapy with carboplatin and vinorelbine for locally advanced non-small-cell lung cancer. *Mol Clin Oncol.* 2(3):405-410 (2014).
 9. Hirose T, Murata Y, Oki Y, Sugiyama T, Kusumoto S, Ishida H, Shirai T, Nakashima M, Yamaoka T, Okuda K, Ohnishi T, Ohmori T.: Relationship of circulating tumor cells to the effectiveness of cytotoxic chemotherapy in patients with metastatic non-small-cell lung cancer. *Oncol Res* 20(2-3):131-7. (2012)
 10. Okuda K, Hirose T, Oki Y, Murata Y, Kusumoto S, Sugiyama T, Ishida H, Shirai T, Nakashima M, Yamaoka T, Ohnishi T, Ohmori T.: Evaluation of the safety and efficacy of combination chemotherapy with vinorelbine and platinum agents for patients with non-small cell lung cancer with interstitial lung disease. *Anticancer Res* 32(12):5475-80 (2012)
 11. Sakai A, Kasahara K, Ohmori T, Kimura H, Sone T, Fujimura M, Nakao S.: MET increases the sensitivity of gefitinib-resistant cells to SN-38, an active metabolite

of irinotecan, by up-regulating the topoisomerase I activity. *J Thorac Oncol.* 7(9): 1337-44. (2012)

中村清吾

1. Rena SHIGENAGA, Sadako AKASHI-TANAKA, Satoko UCHIDA, Murasaki IKEDA, Hiroto OYAMA, Reiko YOSHIDA, Kenya SUZUKI, Katsutoshi ENOKIDO, Terumasa SAWADA, Junko YOTSUMOTO, Seigo NAKAMURA
BRCA1/2 mutation frequency is high in Japanese triple negative breast cancer patients. *The Showa university journal of medical science* 26 2014
2. Sadako Akashi-Tanaka, Chie Watanabe, Tomoko Takamaru, Takashi Kuwayama, Murasaki Ikeda, Hiroto Ohyama, Miki Mori, Reiko Yoshida, Rikako Hashimoto, Sawada Terumasa, Katsutoshi Enokido, Yuko Hirota, Hiromi Okuyama, Seigo Nakamura
BRCAness predicts resistance to taxane-containing regimens in triple negative breast cancer during neoadjuvant chemotherapy.
Clinical Breast Cancer 2015.2

佐々木康綱

1. Yuko Akiyama, Ken-ichi Fujita, Hiroo Ishida, Yu Sunakawa, Keishi Yamashita, Kaori Kawara, Keisuke Miwa, Shigehira Saji, Yasutsuna Sasaki: **Association of *ABCC2* genotype with efficacy of first-line FOLFIRI in Japanese patients with advanced colorectal cancer.** *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **27(3)**, 325-335 (2012).
2. Ken-ichi Fujita, Minako Sugiyama, Yuko Akiyama, Kazuhito Hioki, Munetaka Kunishima, Kodai Nishi, Masato Kobayashi, Keiichi Kawai, Yasutsuna Sasaki: *N*-Isopropyl-*p*-iodoamphetamine hydrochloride (IMP) is predominantly metabolized by CYP2C19. *Drug Metab. Dispos.*, **40(5)**, 843-846 (2012).
3. Yu Sunakawa, Ken-ichi Fujita, Wataru Ichikawa, Hiroo Ishida, Keishi Yamashita, Kazuhiro Araki, Keisuke Miwa, Kaori Kawara, Yuko Akiyama, Wataru Yamamoto, Fumio Nagashima, Shigehira Saji, Yasutsuna Sasaki: A phase I study of infusional 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) in Japanese patients with advanced colorectal cancer who harbor *UGT1A1**1/*1, *1/*6, or *1/*28. *Oncology*, **82(4)**, 242-248 (2012).
4. Yuichi Ando, Kenji Kawada, Megumi Inada, Sachi Morita, Ayako Mitsuma, Yoshinari Yasuda, Mariko Hiramatsu, Yasushi Fujimoto, Ken-ichi Fujita: Pharmacokinetic study of S-1 in patients in whom inulin clearance was measured. *Oncology*, **83(1)**, 38-44 (2012).

5. Tetsuya Sasaki, Ken-ichi Fujita, Yu Sunakawa, Hiroo Ishida, Keishi Yamashita, Keisuke Miwa, Shigehira Saji, Yasuhisa Kato, Yasutsuna Sasaki: Concomitant polypharmacy is associated with irinotecan-related adverse drug reactions in patients with cancer. *Int. J. Clin. Oncol.*, **18(4)**, 735-742 (2013).
6. Nao Setoguchi, Norito Takamura, Ken-ichi Fujita, Kenji Ogata, Jin Tokunaga, Toyotaka Nishio, Etsuo Chosa, Keiichi Kawai, Ryuichi Yamamoto: A diclofenac suppository-nabumetone combination therapy for arthritic pain relief and a monitoring method for the diclofenac binding capacity of HSA site II in rheumatoid arthritis. *Biopharm. Drug Dispos.*, **34(2)**, 125-136 (2013).
7. Brian D. Furmanski, Shuiying Hu, Ken-ichi Fujita, Lie Li, Alice A. Gibson, Laura J. Janke, Richard T. Williams, John D. Schuetz, Alex Sparreboom, Sharyn D. Baker: Contribution of Abcc4-mediated gastric transport to the absorption and efficacy of dasatinib. *Clin. Cancer Res.*, **19(16)**, 4359-4370 (2013).
8. Ken-ichi Fujita, Tomoko Sugiura, Hidenori Okumura, Saki Umeda, Noritaka Nakamichi, Yusuke Watanabe, Hiromichi Suzuki, Yu Sunakawa, Ken Shimada, Kaori Kawara, Yasutsuna Sasaki, Yukio Kato: Direct inhibition and down-regulation by uremic plasma components of hepatic uptake transporter for SN-38, an active metabolite of irinotecan, in humans. *Pharm. Res.*, **31(1)**, 204-215 (2014).
9. Toshikado Kaneta, Ken-ichi Fujita, Yuko Akiyama, Kaori Kawara, Yu Sunakawa, Asuka Kawachi, Ken Shimada, Yasutsuna Sasaki: No pharmacokinetic alteration of docetaxel following coadministration of aprepitant 3 h before docetaxel infusion. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **74(3)**, 539-547 (2014).
10. Kodai Nishi, Asuka Mizutani, Naoto Shikano, Ken-ichi Fujita, Masato Kobayashi, Masahiro Ono, Ryuichi Nishii, Yasutsuna Sasaki, Seigo Kinuya, Keiichi Kawai: *In Vivo* Radioactive Metabolite Analysis for Individualized Medicine: A Basic Study of a New Method of CYP Activity Assay using ¹²³I-IMP. *Nucl. Med. Biol.*, **42(2)**, 171-176 (2015).
11. Wataru Ichikawa, Keisuke Uehara, Keisuke Minamimura, Chihiro Tanaka, Yasumasa Takii, Hideaki Miyauchi, Sotaro Sadahiro, Ken-ichi Fujita, Toshikazu Moriwaki, Masato Nakamura, Takehiro Takahashi, Akihito Tsuji, Katsunori Shinozaki, Satoshi Morita, Yuichi Ando, Yukihiro Okutani, Masahiro Sugihara, Toru Sugiyama, Yasuo Ohashi, Yuh Sakata: An internally and externally validated nomogram for predicting the risk of irinotecan-induced severe neutropenia in advanced colorectal cancer patients. *Br. J. Cancer*, **112(10)**, 1709-1716 (2015).
12. Takahiro Amemiya, Masashi Honma, Yoshiaki Kariya, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Yoshihisa Kurachi, Ken-ichi Fujita, Yasutsuna Sasaki, Yukio Homma, Darrel R Abernethy, Haruki Kume, Hiroshi Suzuki: Elucidation of the molecular mechanisms underlying adverse

- reactions associated with a kinase inhibitor using systems toxicology. *npj Syst. Biol. Appl.*, Published online (2015).
13. Ken-ichi Fujita, Etsuko Yoshino, Kaori Kawara, Kazuya Maeda, Hiroyuki Kusuhara, Yuichi Sugiyama, Taro Yokoyama, Toshikado Kaneta, Hiroo Ishida, Yasutsuna Sasaki: A clinical pharmacokinetic microdosing study of docetaxel with Japanese patients with cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **76(4)**, 793-801 (2015).
 14. Ken-ichi Fujita, Yusuke Masuo, Hidenori Okumura, Yusuke Watanabe, Hiromichi Suzuki, Yu Sunakawa, Ken Shimada, Kaori Kawara, Yuko Akiyama, Masanori Kitamura, Munetaka Kunishima, Yasutsuna Sasaki, Yukio Kato: Increased plasma concentrations of unbound SN-38, the active metabolite of irinotecan, in cancer patients with severe renal failure. *Pharm. Res.*, **33(2)**, 269-282 (2016).
 15. Takashi Shibata, Tomoki Ebata, Ken-ichi Fujita, Tomoya Shimokata, Osamu Maeda, Ayako Mitsuma, Yasutsuna Sasaki, Masato Nagino, Yuichi Ando: Optimal dose of gemcitabine for the treatment of biliary tract or pancreatic cancer in patients with liver dysfunction. *Cancer Sci.*, **107(2)**, 168-172 (2016).
 16. *¹Takashi Hirose, Ken-ichi Fujita, Sojiro Kusumoto, Yasunari Oki, Yasunori Murata, Tomohide Sugiyama, Hiroo Ishida, Takao Shirai, Masanao Nakashima, Toshimitsu Yamaoka, Kentaro Okuda, Tohru Ohmori, Yasutsuna Sasaki: Association of pharmacokinetics and pharmacogenomics with safety and efficacy of gefitinib in patients with EGFR mutation positive advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, **93**, 69-76 (2016).
 17. Tomoyuki Okabe, Takeharu Ogura, Takashi Yoshimura, Yoshiyuki Tanaka, Hiromu Toyoda, Ken-ichi Fujita, Yasutsuna Sasaki: Bioequivalence studies of a generic formulation (SW651K) to the brand drug S-1 in tumor-bearing rat models. *J. Bioequiv. Availab.*, **8(3)**, 112-117 (2016).
 18. Mototsugu Matsunaga, Toshikado Kaneta, Keisuke Miwa, Wataru Ichikawa, Ken-ichi Fujita, Fumio Nagashima, Junji Furuse, Masayoshi Kage, Yoshito Akagi, Yasutsuna Sasaki: A comparison of four methods for detecting *KRAS* mutations in formalin-fixed specimens from metastatic colorectal cancer patients. *Oncol Lett.*, **12(1)**, 150-156 (2016).
 19. Ken-ichi Saito, Yutaka Inoue, Yoji Ikegami, Izumi Nanbo, Mari Onozuka, Kazumi Sano, Hisahiro Yoshida, Toshihiro Sakamoto, Emi Tatebayashi, Ken-ichi Fujita, Yasutsuna Sasaki, Takaki Kitazawa: Investigation of bioequivalence between brand-name and generic irinotecan products. *Anticancer Res.*, **39**, 5957-5964 (2016).
 20. Kosuke Takata, Ken-ichi Fujita, Yutaro Kubota, Hiroo Ishida, Wataru Ichikawa, Ken Shimada, Takashi Sekikawa, Iori Taki-Takemoto, Daisuke Kamei, Shinichi Iwai, Yasutsuna

Sasaki: Cost-minimization analysis of adjuvant chemotherapy regimens given to patients with colorectal cancer in Japan. *J. Pharm. Health Care Sci.*, in press (2016).

代田達夫

1. Motohashi H, Mukudai Y, Ito C, Kato K, Shimane T, Kondo S, Shirota T: Tumor protein D52 expression is post-transcriptionally regulated by intercellular antigen (TIA) 1 and TIA-related protein via mRNA stability. *Biochemical J* 474: 1669-1687, 2017.
2. Kato K, Mukudai Y, Motohashi H, Ito C, Kamoshida S, Shimane T, Kondo S, Shirota T: Opposite effects of tumor protein D (TPD) 52 and TPD-54 on oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 50: 1634-1646, 2017.
3. Mukudai Y, Zhang M, Shiogama S, Kondo S, Ito C, Motohashi H, Kato K, Fujii M, Shintani S, Shigemori H, Yazawa K and Shirota T: Methanol and butanol extracts of paeonia lutea leaves repress metastasis of squamous cell carcinoma. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016; Volume 2016; Article ID 6087213.
4. Nagasaki M, Kondo S, Mukudai S, Kamatani T, Akizuki A, Yaso A, Shimane T and Shirota T. Clinicopathological implications of vascular endothelial growth factor 165b expression in oral squamous cell carcinoma stroma. *Oncol Rep*, 36:573-81, 2016.
5. Kondo S, Mukudai Y, Soga D, Nishida T, Takigawa M, Shirota T.: Differential expression of vascular endothelial growth factor in high- and low-metastasis cell lines of salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Anticancer Research* 34:671-7, 2014.
6. *¹Soga D, Yoshida S, Shiogama S, Miyazaki H, Kondo S, Shintani S.: microRNA expression profiles in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 30:579-83, 2013

大滝博和

1. Miyamoto K, Tsumuraya T, Ohtaki H, Dohi K, Satoh K, Xu Z, Tanaka S, Murai N, Watanabe J, Sugiyama K, Aruga T, Shioda S. PACAP38 suppresses cortical damage in mice with traumatic brain injury by enhancing antioxidant activity. *J Mol Neurosci*. 2014;54:370-9.
2. Tsuchida M, Nakamachi T, Sugiyama K, Tsuchikawa D, Watanabe J, Hori M, Yoshikawa A, Imai N, Kagami N, Matkovits A, Atsumi T, Shioda S. PACAP stimulates functional recovery after spinal cord injury through axonal regeneration. *J Mol Neurosci*. 2014 54:380-7.

3. *¹Nakamachi T, Sugiyama K, Watanabe J, Imai N, Kagami N, Hori M, Arata S, Shioda S. Comparison of expression and proliferative effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptors on human astrocytoma cell lines. *J Mol Neurosci.* 2014;54:388-94.
4. Nakamura K, Nakamachi T, Endo K, Ito K, Machida T, Oka T, Hori M, Ishizaka K, Shioda S. Distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the human testis and in testicular germ cell tumors. *Andrologia.* 2014;46:465-71.
5. Xu Z, Ohtaki H, Watanabe J, Miyamoto K, Murai N, Sasaki S, Matsumoto M, Hashimoto H, Hiraizumi Y, Numazawa S, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) contributes to the proliferation of hematopoietic progenitor cells in murine bone marrow via PACAP-specific receptor. *Sci Rep.* 2016 6:22373.
6. Nakamachi T, Ohtaki H, Seki T, Yofu S, Kagami N, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Mark L, Lanekoff I, Kiss P, Farkas J, Reglodi D, Shioda S. PACAP suppresses dry eye signs by stimulating tear secretion. *Nat Commun.* 2016 7:12034.
7. Matoba Y, Nonaka N, Takagi Y, Imamura E, Narukawa M, Nakamachi T, Shioda S, Banks WA, Nakamura M. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhances saliva secretion via direct binding to PACAP receptors of major salivary glands in mice. *Anat Rec (Hoboken).* 2016 299:1293-9.
8. Sasaki S, Watanabe J, Ohtaki H, Matsumoto M, Murai N, Nakamachi T, Hannibal J, Fahrenkrug J, Hashimoto H, Watanabe H, Sueki H, Honda K, Miyazaki A, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes eccrine gland sweat secretion. *Br J Dermatol.* 2016 Jul 25. doi: 10.1111/bjd.14885. [in press]

< 図書 >

柴沼 質子

総説 :

1. Intracellular redox and mitochondria regulation by transforming growth factor- β —its implication in induction of epithelial-mesenchymal transition. M. Shibamura, K. Mori and F. Ishikawa *J. Cell Signaling*, doi:10.4172/JCS.1000106. 2016).
2. 細胞接着斑タンパク質 Hic-5 による足場依存性細胞増殖の制御機構
柴沼 質子 *生体の科学* **64**: 239-243. 2013
3. A mobile molecular scaffold regulating the anchorage dependence of cell growth. Shibamura, M., Mori, K., and Nose, K. *Int J. Cell Biol.*, 426138. 2012

宮崎 章

総説 :

1. Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Arita S, Miyauchi A, Miyazaki T, **Miyazaki A**. Hydrogen peroxide-inducible clone 5 (Hic-5) as a potential therapeutic target for vascular and other disorders. *J Atheroscler Thromb.* 2012;19(7):601-607.
2. Miyazaki T, Koya T, Kigawa Y, Oguchi T, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, **Miyazaki A**. Calpain and Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2013;20(3):228-237.
3. Kigawa Y, Miyazaki T, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, **Miyazaki A**. Functional heterogeneity of NADPH oxidases in atherosclerotic and aneurysmal diseases. *J Atheroscler Thromb.* 2016 in press.

大森 亨

著書

1. 大森 亨:薬剤耐性とその克服 新臨床腫瘍学【改訂第 4 版】日本臨床腫瘍学会編 南江堂 319-322 (2015)
2. 大森 亨:抗がん薬の薬理学(薬剤耐性とその克服)新臨床腫瘍学【改訂第 3 版】日本臨床腫瘍学会編 南江堂 231-234 (2012)

総説

1. 大森 亨:薬剤耐性研究—次世代シークエンサーを用いた抗がん剤感受性予測 特集 肺がんの診断と治療—最新の話 日本医師会雑誌 第 142 巻 第 1 号 52 (2015)

佐々木 康綱

総説

1. 藤田健一, 佐々木康綱: 乳がん治療におけるエベロリムその薬理作用・薬物動態 エベロリムスによる乳がん治療の新展開(野口眞三郎), メディカルレビュー社 査読無し, pp. 58-68 (2014).
2. 藤田健一, 佐々木康綱: 肝がん 「腎と透析」2013 年増刊号 特集: 腎疾患治療薬マニュアル 2013-2014(北岡建樹, 飯野靖彦, 木村健二郎, 秋澤忠男, 大塚基嗣, 服部元史), 東京医学社 査読無し, pp. 677-680 (2013).
3. 藤田健一, 佐々木康綱: 肺がん 「腎と透析」2013 年増刊号 特集: 腎疾患治療薬マニュアル 2013-2014(北岡建樹, 飯野靖彦, 木村健二郎, 秋澤忠男, 大塚基嗣, 服部元史), 東京医学社 pp. 681-685 (2013).

柴沼質子

1. Rac1 によるインテグリン発現制御とその再接着能への影響

森一憲、石川文博、柴沼質子

第 74 回 日本癌学会学術総会

2015 年 10 月 9 日 名古屋

2. ミトコンドリア活性はがん細胞の増殖に必須である（ミトコンドリア活性による新奇細胞周期制御機構）

柴沼質子、石川文博、森一憲

第 74 回 日本癌学会学術総会

2015 年 10 月 10 日 名古屋

3. TRAIL は p38MAPK の活性化を介して脱接着誘導性細胞死を制御する

石川文博、森一憲、柴沼質子

第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会

2015 年 12 月 1 日 神戸

4. Rac1 活性によるインテグリン $\beta 4$ 発現制御とその再接着能への影響

長谷川大三、高橋亮伍、森一憲、石川文博、柴沼質子

第 136 回 日本薬学会

2016 年 3 月 29 日 横浜

5. ミトコンドリア機能不全による HMGA2 誘導の意義：肝細胞がんの増殖能維持と EMT 誘導への関与

柴沼質子、石川文博、森一憲

第 73 回 日本癌学会学術総会

2014 年 9 月 26 日 横浜

6. HIC-5 による TGF- β 誘導性 MMP-9 発現誘導と足場非依存性増殖能/転移能の抑制的制御

森一憲、石川文博、柴沼質子 第 73 回 日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 26 日 横浜

7. TRAIL は p38MAPK の活性化を介して脱接着誘導性細胞死を制御する

石川文博, 森一憲, 柴沼質子 第 73 回 日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 27 日 横浜

8. HMGA2 機能のがん化における意義—ミトコンドリアゲノムストレス誘導性増殖抑制機構の克服と悪性化形質誘導

柴沼質子, 石川文博, 森一憲 第 37 回 日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 27 日 横浜

9. TGF- β による HMGA2 と EMT 関連遺伝子の発現制御はチオレドキシニン感受性を示す

石川文博, 森一憲, 柴沼質子 第 72 回 日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 3~5 日 横浜

10. FAK による足場依存性増殖制御機構

森一憲, 石川文博, 柴沼質子 第 72 回 日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 3~5 日 横浜

11. Phenotypic disruption of mammary epithelial cells caused by mitochondrial dysfunction and the underlying mechanisms.

Shibanuma, M., Mori, K., Ishikawa, F. Keystone Symposia 2012 年 Banff, Albert, Canada

12. ミトコンドリア転写/複製機構の下方制御による足場非依存性細胞増殖能の制御

石川文博, 森一憲, 柴沼質子 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 札幌

13. 細胞接着喪失応答性転写制御機構の解析

森一憲, 石川文博, 柴沼質子 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 札幌

14. 肝細胞がんにおけるミトコンドリア DNA 変異と悪性化形質誘導との関係について

川島彩耶, 佐藤祐弥, 原田佳弘, 柴沼質子 第 56 回日本薬学会関東支部大会 2012 年 10 月 東京

15. 接着喪失により誘導される細胞死のメカニズムに関する検討

厚芝光紀, 荘司明, 三浦徹也, 森一憲, 柴沼質子 第 56 回日本薬学会関東支部大会 2012 年 10 月 東京

大森 亨

国内学会

1. Yamaoka T, Ohmori T, Ohba M, Arata S, Murata Y, Kishino Y, Kusumoto S, Hiroo Ishida, Ohnishi T, Sasaki Y.: Mechanism underlying acquisition of dual resistance to EGFR and MET inhibitors by EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells . 14th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology, Kobe, 2016
2. Ohmori T, Yamaoka T, Arata S, Ohba M, Murata Y, Kishino Y, Kusumoto S, Hirose T, Ohnishi T, Nishio K.: Combination effect of afatinib and BI 83845, a humanized IGF ligand-neutralizing antibody, on EGFR-TKI-resistant NSCLC. 75th Annual Meeting of Japanese Cancer Association, Yokohama, 2016
3. Yamaoka T, Ohmori T, Ohba M, Arata S, Murata Y, Kishino Y, Kusumoto S, Hiroo Ishida, Ohnishi T, Sasaki Y.: Dual resistance of EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells to EGFR and MET inhibitors. 75th Annual Meeting of Japanese Cancer Association, Yokohama, 2016
4. Suzuki T, Nagasawa I, Yamaoka T, Ohmori T, Nishio K, Koyama K, Ogasawara Y.: The effect of ErbB3 phosphorylation for miR-205 regulation in gefitinib-resistant lung cancer cell lines. 74th Annual Meeting of Japanese Cancer Association, Nagoya, 2015
5. Yamaoka T, Ohmori T, Ohba M, Toya E, Kishino Y, Murata Y, Kusumoto S, Ishida H, Ohnishi T, Sagara H, Sasaki Y.: Mechanism underlying acquisition of dual resistance to EGFR & MET inhibitors by EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells. 74th Annual Meeting of Japanese Cancer Association, Nagoya, 2015
6. Yamaoka T, Ohmori T, Oki Y, Murata Y, Kusumoto S, Ishida H, Shirai T, Hirose T, Ohnishi T, Sasaki Y.: EGFR transactivation by TNF protects EGFR-TKI, gefitinib induced pulmonary injury in SP-C/TNF transgenic mice. 73th Annual Meeting of Japanese Cancer Association, Yokohama, 2014
7. Ito H, Hasegawa T, Hosomiti K, Hasegawa H, Inoue I, Kumura S, Ohmori T, Kudo S, Matsukawa M, Inoue H.: Development of simple blood test for diagnosis of gastrointestinal and pancreas cancer. 73th Annual Meeting of Japanese Cancer Association, Yokohama, 2014

8. Ohba M, Toya E, Yamaoka T, Ohmori T, Sasaki Y.: PKC η controls the proliferation of lung adenocarcinoma cells via EGFR and MET endocytic trafficking. 73th Annual Meeting of Japanese Cancer Association, Yokohama, 2014
9. Suzuki T, Nagasawa I, Yamaoka T, Ohmori T, Nishio K, Koyama K, Ogasawara Y.: The effect of kinase signaling for miR-205 regulation in gefitinib-resistan lung cancer cell lines. 73th Annual Meeting of Japanese Cancer Association, Yokohama, 2014
10. Yamaoka T, Ohmori T, Ohba M, Toya E, Kishino Y, Murata Y, Kusumoto S, Ishida H, Ohnishi T, Sagara H, Sasaki Y.: TNF transactivation of EGFR protects EGFR-TKI induced pulmonary injury in SPC-TNF transgenic mice. 12th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology, Fukuoka, 2014
11. Hirose T, Fujita K, Kusumoto S, Oki Y, Murata Y, Sugiyama T, Ishida H, Shirai T, Nakashima M, Yamaoka T, Okuda K, Ohmori T, Sasaki Y.: Association of pharmacokinetics or pharmacogenomics with toxicity of erlotinib in patient with advanced NSCLC. 12th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology, Fukuoka, 2014
12. Ohmori T, Yamaoka T, Toya E, Ohba M, Koizumi F, Nishio K, Akinaga S, Sasaki Y.: Tivantinib, shows a synergistic growth-inhibitory effect with erlotinib through enhanced degradation of c-MET protein. 12th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology, Fukuoka, 2014
13. Toya E, Ohba M, Yamaoka T, Ohmori T, Sasaki Y.: Involvement of protein kinase C η in the migration and invasion of human lung adenocarcinoma cells. 12th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology, Fukuoka, 2014
14. Ohba M, Toya E, Yamaoka T, Ohmori T, Sasaki Y.: PKC η controls the proliferation of lung adenocarcinoma cells via EGFR and MET endocytic trafficking. 12th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology, Fukuoka, 2014

15. Hirose T, Fujita K, Kusumoto S, Oki Y, Murata Y, Sugiyama T, Ishida H, Shirai T, Nakashima M, Yamaoka T, Okuda K, Ohmori T, Sasaki Y.: Clinical benefit of 2nd EGFR-TKI retreatment on overall survival in patients with advanced non-small cell lung cancer. 11th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology, Sendai, 2013
16. Ito H, Hasegawa T, Inoue H, Sando N, Hasegawa K, Hasegawa Y, Inoue I, Ohmori T, Kumura S, Kudo S.: Novel methodology of integrated omics analysis by usint surface enhanced Raman scattering (SERS): A preliminary study. 72nd Annual Meeting of Japanese Cancer Association, Yokohama, 2012
17. Yamaoka T, Sugiyama T, Ishida H, Shirai T, Okuda K, Toya E, Ohba M, Ohmori T, Sasaki Y.: The characteristics of dual resistance to EGFR & MET inhibitors in pulmonary adenocarcinoma, PC-9 cells. 72nd Annual Meeting of Japanese Cancer Association, Yokohama, 2012
18. Ohmori T, Yamaoka T, Ichihashi Y, Hirose T, Saijo N.: HSP70 causes EGFR-TKIs resistance in a mutant EGFR expressed non-small cell lung cancer. 10th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology, Osaka, 2012

国際学会

1. Ohmori T, Yamaoka Y, Ohba M, Murata Y, Kishida Y, Kusumoto S, Ishida H, Ohnishi T.: Combination effect of afatinib and BI836845, a fully human IGF ligand-neutralizing antibody, on EGFR-TKI-resistant non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. 107th American Association of Cancer Research Annual Meeting, New Orleans LA, USA 2016
2. Yamaoka T, Ohmori T, Ohba M, Murata Y, Kishino Y, Kusumoto S, Ishida H, Ohnishi T, Sagara H, Sasaki Y.: Mechanism underlying acquisition of dual resistance to EGFR and MET inhibitors by EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells. 107th American Association of Cancer Research Annual Meeting, New Orleans LA, USA 2016
3. Suzuki T, Nagasawa I, Yamaoka T, Ohmori T, Nishio K, Koyama K,

- Ogasawara Y.: The effect of kinase signaling for miR-205 regulation in gefitinib-resistant lung cancer cell lines. 107th American Association of Cancer Research Annual Meeting, New Orleans LA, USA 2016
4. Suzuki T, Nagasawa I, Yamaoka T, Ohmori T, Nishio K, Koyama K, Ogasawara Y.: Contribution of miR-205 in gefitinib-resistant lung cancer cell lines. 105th American Association of Cancer Research Annual Meeting, San Diego CA, USA 2014
 5. Yamaoka T, Oki Y, Murata Y, Kusumoto S, Ishida H, Hirai T, Toya E, Ohba M, Fujita K, Arata S, Ohmori T, Ohnishi T, Sagara H, Sasaki Y.: TNF transactivation of EGFR protects EGFR-TKI, gefitinib induced pulmonary epithelial cell apoptosis and injury in TNF transgenic mice. 105th American Association of Cancer Research Annual Meeting, San Diego CA, USA 2014
 6. Nakashima M, Hirose T, Oki Y, Murata Y, Sugiyama T, Ishida H, Yamaoka T, Ohmori T, Ohnishi T.: Clinical benefit of second EGFR-TKI retreatment on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring EGFR-mutation positive after failure of the initial EGFR-TKI treatment: A retrospective analysis. 2013 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Chicago IL, USA 2013
 7. Yamaoka T, Ichihashi Y, Murata Y, Oki Y, Sugiyama T, Ishida H, Shirai T, Nakashima M, Okuda K, Hirose T, Ohnishi T, Ohmori T.: The characteristics of an acquired dural resistance to EGFR & MET inhibitors in non-small cell lung cancer, harboring active mutation of EGFR. 104th American Association of Cancer Research Annual Meeting, Washington DC, USA 2014
 8. Hirose T, Noda H, Okuda K, Abe S, Oto Y, Kusumoto S, Sugiyama T, Ishida H, Shirai T, Nakashima M, Yamaoka T, Ohmori T, Yoshida K, Nakamura Y, Adachi M.: Cancer vaccination trial with novel multiple peptides in previously treated advanced non-small cell lung cancer. 2012 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Chicago IL, USA 2012
 9. Ohmori T, Kadofuku T, Ichihashi Y, Yamaoka T, Hirose T, Adachi M, Saijo N.: HSP70 may cause EGFR-TKIs-resistance due to inhibit drug binding to EGFR

in the cells that expressed mutant EGFR. 102nd American Association of Cancer Research Annual Meeting, Chicago IL, USA 2012

10. Yamaoka T, Frey M, Polk DB, Oki Y, Murata Y, Sugiyama T, Kusumoto S, Ishida H, Shirai T, Nakashima M, Okuda K, Ohnishi T, Hirose T, Ohmori T, Adachi M.: Specific epidermal growth factor receptor autophosphorylation sites promote epithelial cell chemotaxis and restitution. 102nd American Association of Cancer Research Annual Meeting, Chicago IL, USA 2012

中村清吾

- ①明石定子 桑山隆志 沢田晃暢 中村清吾

Significance of BRCA-1 like subtype in predicting chemotherapy response in TNBC.

第 72 回日本癌学会 2013. 10. 4

- ②明石定子 桑山隆志 渡邊知映 中村清吾ら

triple negative 乳癌における BRCAness 測定の意義と化学療法効果予測

第 21 回日本乳癌学会学術総会 2013. 6

- ③明石定子 桑山隆志 中村清吾ら

Significance of BRCA-1 like subtype in predicting chemotherapy response in TNBC

第 51 回日本癌治療学会 2013. 10

- ④桑山隆志 明石定子 中村清吾ら

原発性乳癌に対する術前化学療法と caveolin-1 の関係

第 21 回日本乳癌学会学術総会 2013. 6

- ⑤吉田玲子 中村清吾 四元淳子ら

BRCA1 陽性者の背景・病理・臨床的特徴の後向視的解析

第 21 回日本乳癌学会学術総会 浜松 2013. 6

- ⑥吉田玲子 中村清吾 四元淳子ら

日本人女性における BRCA1/2 遺伝子変異予測モデルの検討

第 58 回 人類遺伝学会 仙台 2013. 11

⑦桑山隆志 中村清吾ら

Primary analysis of a randomized phase II, multicenter trial : Neoadjuvant weekly Nab-paclitaxel 100mg/m² followed by FE₁₀₀C compared with Docetaxel 75mg/m² followed by FE₁₀₀C for early breast cancer in Japan.

ASCO Breast cancer symposium 2015.9

⑧明石定子 桑山隆志 中村清吾ら

トリプルネガティブ乳癌における BRCAness による治療効果予測と予後

第 22 回日本乳癌学会学術総会 2014.7

⑨吉田玲子 中村清吾ら

Evaluation of the BRCA1 and BRCA2 mutation prediction models in Japanese breast cancer patients.

ASCO Breast cancer symposium 2014.9

⑩吉田玲子 中村清吾ら

Analysis of Clinical Characteristics in Breast Cancer Patients with The Japanese Founder Mutation of *BRCA1* “L63X”

ASCO 2015 Breast Cancer Symposium 2015.9

⑪森美樹 渡辺智子 明石定子 広田由子 中村清吾

術前化学療法後に病理学的完全奏功が得られたトリプルネガティブ症例の次世代シーケンスによる検討

第 24 回日本乳癌学会学術総会 2016.7

佐々木康綱

国際学会

1. Toshimitsu Yamaoka, Yasunari Oki, Yasunori Murata, Sojiro Kusumoto, Hiroo Ishida, Takao Shirai, Etsuko Toya, Motoi Ohba, Ken-ichi Fujita, Satoru Arata, Tohru Ohmori, Tsukasa Ohnishi, Hironori Sagara, Yasutsuna Sasaki: TNF transactivation of EGFR protects EGFR-

- TKI, gefitinib induced pulmonary epithelial cell apoptosis and injury in TNF transgenic mice. 105th American Association for Cancer Research annual meeting, San Diego, 2014, 4.
2. Ken-ichi Fujita, Hidenori Okumura, Yusuke Masuo, Yu Sunakawa, Ken Shimada, Kaori Kawara, Yuko Akiyama, Yasutsuna Sasaki, Yukio Kato: Change in plasma protein binding of SN-38, an active metabolite of irinotecan, in cancer patients with severe renal failure (SRF). **The 39th European Society for Medical Oncology annual meeting, Madrid, 2014, 9.**
 3. Takashi Hirose, Ken-ichi Fujita, Sojiro Kusumoto, Yasunari Oki, Yasunori Murata, Tomohide Sugiyama, Hiroo Ishida, Takao Shirai, Masanao Nakashima, Toshimitsu Yamaoka, Kentaro Okuda, Tsukasa Ohnishi, Tohru Ohmori, Yasutsuna Sasaki, Atsuhisa Tamura, Ken Ohta: Association of pharmacokinetics or pharmacogenomics with toxicity of erlotinib in patients with recurrent advanced non-small cell lung cancer. **The 39th European Society for Medical Oncology annual meeting, Madrid, 2014, 9.**
 4. Ritsuko Obuchi, Xiao-Pen Lee, Makiko Hirosawa, Hiroo Ishida, Ken-ichi Fujita, Susumu Nittono, Masato Yoshida, Yasutsuna Sasaki, Keizo Sato, Haruo Takahashi: Determination of tegafur and 5-fluorouracil in tear by HILIC-MS/MS. Asia-ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) 2015, Yokohama, 2015, 2.
 5. Ken-ichi Fujita, Yusuke Masuo, Hidenori Okumura, Yasutsuna Sasaki and Yukio Kato: Optimization of the dose of irinotecan in cancer patients with severe renal failure (SRF)

based on physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) model. **116th American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics annual meeting, New Orleans, 2015, 3.**

6. Ken-ichi Fujita, Etsuko Yoshino, Kawara Kawara, Kazuya Maeda, Hiroyuki Kusuhara, Yuichi Sugiyama, Taro Yokoyama, Toshikado Kaneta, Hiroo Ishida, Yasutsuna Sasaki: A clinical pharmacokinetic microdosing study of docetaxel with Japanese cancer patients. **The 40th European Society for Medical Oncology annual meeting, Wien, 2015, 9.**

国内学会

1. Keisuke Miwa, Ken-ichi Fujita, Wataru Ichikawa, Kaori Kawara, Fumio Nagashima, Junji Furuse, Yasutsuna Sasaki: A comparison for methods for detecting KRAS mutations in formalin-fixed colorectal cancer specimens. The 11th Japanese Society of Medical Oncology annual meeting, Sendai, 2013, 8
2. Takashi Shibata, Tomoki Ebata, Ken-ichi Fujita, Sachi Morita, Megumi Inoue, Mihoko Sugishita, Ayako Mitsuma, Yasutsuna Sasaki, Masato Nagino, Yuichi Ando: Clinical dose-finding study of gemcitabine in patients with biliary tract or pancreatic cancer with liver dysfunction. The 11th Japanese Society of Medical Oncology annual meeting, Sendai, 2013, 8
3. 金田聡門, 藤田健一, 秋山祐子, 河原香織, 河知あすか, 砂川優, 嶋田顕, 畝川芳彦, 佐々木康綱: 日本人固形がん患者におけるアプレピタント併用下のドセタキセル血漿中濃度曲線下面積の上昇効果. 第11回日本臨床腫瘍学会, 仙台, 2013, 8

4. Ken-ichi Fujita, Noritaka Nakamichi, Yu Sunakawa, Ken Shimada, Kaori Kawara, Yasutsuna Sasaki, Yukio Kato: Down-regulation by uremic plasma components of hepatic uptake transporter for SN-38 in humans. 72nd Japan Cancer Association meeting, Yokohama, 2013, 10
5. Hidenori Okumura, Ken-ichi Fujita, Yusuke Masuo, Tomoko Sugiura, Noritaka Nakamichi, Yusuke Watanabe, Hiromichi Suzuki, Yu Sunakawa, Ken Shimada, Kaori Kawara, Yasutsuna Sasaki, Yukio Kato: Direct Inhibition and Down-regulation by Uremic Plasma Components of Hepatic Uptake Transporter for SN-38, an Active Metabolite of Irinotecan, in Humans. 28th Japanese Society for the Study of Xenobiotics annual meeting, Tokyo, 2013, 10
6. 金田聡門, 藤田健一, 秋山祐子, 河原香織, 河知あすか, 砂川優, 嶋田顕, 畝川芳彦, 佐々木康綱: 日本人の固形がん患者におけるアプレピタント併用下のドセタキセル血漿中濃度曲線下面積の上昇効果. 第34回日本臨床薬理学会, 東京, 2013, 12
7. 廣瀬敬, 藤田健一, 楠本壮二郎, 白井崇生, 村田泰則, 大木康成, 杉山 智英, 石田博雄, 中嶋賢尚, 山岡利光, 奥田健太郎, 大西司, 大森亨, 佐々木康綱, 田村厚久, 大田健: 非小細胞肺癌に対するエルロチニブの毒性に影響を与える薬物動態, 薬理遺伝学的検討. 第54回日本呼吸器学会, 大阪, 2014, 4
8. 藤田健一, 吉野悦子, 河原香織, 前田和哉, 杉山雄一, 佐々木康綱: 日本人がん患者におけるドセタキセル体内動態のマイクロドージング研究. 第12回日本臨床腫瘍学会, 福岡, 2014, 7

9. Takashi Hirose, Ken-ichi Fujita, Sojiro Kusumoto, Takao Shirai, Tomohide Sugiyama, Masanao Nakashima, Tohru Ohmori, Yasutsuna Sasaki, Atsuhisa Tamura, Ken Ohta: Association of pharmacokinetics or pharmacogenomics with toxicity of erlotinib in patients with advanced NSCLC. The 12th Japanese Society of Medical Oncology annual meeting, Fukuoka, 2014, 7
10. 小木達也, 増尾友佑, 藤田健一, 北村正典, 奥村英典, 中道範隆, 佐々木康綱, 国嶋崇隆, 加藤将夫: 尿毒症物質による肝膜輸送体OATP1B1の阻害様式. 第36回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 徳島, 2014, 11
11. 藤田健一, 増尾友祐, 奥村英典, 砂川優, 嶋田顕, 河原香織, 秋山祐子, 佐々木康綱, 加藤将夫: 極めて腎機能が低下したがん患者において, SN-38の血漿蛋白結合は低下し遊離形濃度が顕著に上昇する. 第35回日本臨床薬理学会学術総会, 松山, 2014, 12
12. 澁谷俊紀, 増尾友佑, 藤田健一, 中道範隆, 佐々木康綱, 加藤将夫: レゴラフェニブの体内動態への排泄トランスポーターの寄与. 第135回日本薬学会年会, 神戸, 2015, 3
13. Ken-ichi Fujita, Yusuke Masuo, Hidenori Okumura, Yasutsuna Sasaki and Yukio Kato: Appropriate dose of irinotecan in cancer patients with severe renal failure (SRF). The 13rd Japanese Society of Medical Oncology annual meeting, Sapporo, 2015, 7

14. Ken-ichi Fujita, Etsuko Yoshino, Kaori Kawara, Kazuya Maeda, Hiroyuki Kusuhara, Yuichi Sugiyama, Taro Yokoyama, Toshikado Kaneta, Hiroo Ishida, Yasutsuna Sasaki: A clinical pharmacokinetic microdosing study of docetaxel with Japanese patients with cancer. 74th Japan Cancer Association meeting, Nagoya, 2015, 10
15. Koki Katayama, Saki Gotoh, Tatsuya Fukami, Hiroo Ishida, Yutaro Kubota, Sojiro Kusumoto, Ken-ichi Fujita, Yasutsuna Sasaki, Miki Nakajima: Comprehensive analysis of miRNA-variants in Japanese healthy subjects, non-small cell lung carcinoma and colorectal cancer patients. 30th Japanese Society for the Study of Xenobiotics annual meeting, Tokyo, 2015, 11
16. Tatsuya Kogi, Yusuke Masuo, Ken-ichi Fujita, Masanori Kitamura, Noritaka Nakamichi, Yasutsuna Sasaki, Munetaka Kunishima, Yukio Kato: Long-lasting inhibition of organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 by endogenous uremic toxin indoxyl sulfate. 30th Japanese Society for the Study of Xenobiotics annual meeting, Tokyo, 2015, 11
17. 藤田健一, 増尾友祐, 奥村英典, 佐々木康綱, 加藤将夫: 極めて腎機能の低下したがん患者におけるイリノテカン塩酸塩の至適投与量の推定. 第36回日本臨床薬理学会学術総会, 東京, 2015, 12
18. 高田昴輔, 石井麻菜, 竹本伊織, 亀井大輔, 藤田健一, 佐々木康綱, 岩井信市: 日本人の抗がん薬投与による認知機能評価法の確立に向けた検討. 第136回日本薬学会年会, 横浜, 2016, 3

19. 高田昂輔, 藤田健一, 滝伊織, 亀井大輔, 佐々木康綱, 岩井信市: 大腸がん術後補助化学療法レジメンの医療経済性の検討. 第26回日本医療薬学会年会, 京都, 2016, 9
20. Ken-ichi Fujita, Yusuke Matsuo, Yutaro Kubota, Yasutsuna Sasaki, Yukio Kato: Roles of BCRP and P-gp in disposition of regorafenib and active metabolites M-2 and M-5. 75th Japan Cancer Association meeting, Yokohama, 2016, 10
21. Erina Yamazaki, Yusuke Masuo, Ken-ichi Fujita, Toshiki Shibutani, Noritaka Nakamichi, Yasutsuna Sasaki, Yukio Kato: Involvement of ABC drug transporters in disposition of active metabolites of tyrosine kinase inhibitor regorafenib. 31st Japanese Society for the Study of Xenobiotics annual meeting, Matsumoto, 2016, 10
22. Natsumi Seba, Yusuke Masuo, Ken-ichi Fujita, Noritaka Nakamichi, Yasutsuna Sasaki, Yukio Kato: Inhibition of human hepatic transporter OATP1B1 by indole metabolites. 31st Japanese Society for the Study of Xenobiotics annual meeting, Matsumoto, 2016, 10
23. 藤田健一, 増尾友佑, 山崎絵里名, 澁谷俊紀, 中道範高, 佐々木康綱, 加藤将夫: レゴラフェニブと活性代謝物の体内動態解析とABC輸送担体の関与. 第37回日本臨床薬理学会学術総会, 米子, 2016, 12

24. 高田昂輔, 藤田健一, 滝伊織, 亀井大輔, 佐々木康綱, 岩井信市: 日本における大腸がん術後補助化学療法のレジメン別医療経済評価. 第137回日本薬学会年会, 仙台, 2017, 3

代田達夫

- 1) 本橋宏美, 棕代義樹: TPD52 遺伝子の発現は TIA-1 及び TIAR によって mRNA の安定性を介して転写後制御される. 第 58 回日本歯科基礎学会学術大会 2016 年 8 月, 札幌.
- 2) 本橋 宏美, 棕代 義樹, 加藤 光佑, 伊藤 千洋, 近藤 誠二, 代田 達夫: PD52mRNA の転写後遺伝子発現制御機構の検索. 第 38 回日本分子生物学会年会合同大会 2015 年 12 月, 神戸.
- 3) 棕代 義樹, 伊藤 千洋, 加藤 光佑, 本橋 宏美, 近藤 誠二, 代田 達夫: TPD52 ファミリー遺伝子の軟骨細胞における増殖・分化に対する役割の検索. 第 34 回日本骨代謝学会学術集会 2016 年 7 月, 大阪.
- 4) 加藤 光佑, 棕代 義樹, 本橋 宏美, 伊藤 千尋: 口腔扁平上皮癌細胞の増殖・浸潤・転移に対する TPD52 ファミリーの相互作用の検索. 第 69 回日本口腔科学会学術集会 2015 年 5 月, 大阪.
- 5) 本橋 宏美, 棕代 義樹, 伊藤 千尋, 加藤 光佑, 近藤 誠二, 代田 達夫: TPD ファミリータンパクの遺伝子発現制御の検索. 第 69 回日本口腔科学会学術集会 2015 年 5 月, 大阪.
- 6) 棕代 義樹, 本橋 宏美, 代田 達夫, 近藤 誠二, 矢澤 一良, 繁森 英幸, Zhang Meilin: *Paeonia lutea* 葉の抽出物による扁平上皮癌の増殖・転移抑制効果. 第 57 回日本歯科基礎学会学術大会 2015 年 9 月, 新潟.
- 7) 宮崎 裕明, 近藤 誠二, 栗原 祐史, 鎌谷 宇明, 代田 達夫: 口腔癌における CD44 を介した癌幹細胞形質獲得機構の解明: 口腔癌における CD44 を介した癌幹細胞形質獲得機構の解明. 第 69 回日本口腔科学会学術集会 2015 年 5 月, 大阪.

<研究成果の公開状況> (上記以外)

シンポジウム・学会等の実施状況、インターネットでの公開状況等
<既に実施しているもの>
各教室のホームページによる、研究成果の情報公開

昭和大学戦略的研究基盤形成事業 報告会
平成 25 年 9 月 21 日 (土)
昭和大学入院棟 17 階 A 会議室

<これから実施する予定のもの>

特になし

1 4 その他の研究成果等

特になし

1.5 「選定時」及び「中間評価時」に付された留意事項及び対応

<「選定時」に付された留意事項>

1. 個別の研究テーマの関連性
2. 前身の事業との差異の明確化

<「選定時」に付された留意事項への対応>

1. 個別の研究テーマの関連性

本プロジェクトには医学部2、歯学部1の臨床系3教室、医学部2、薬学部1、研究所の基礎系4教室で構成し、対象とするがん腫も乳がん、肺がん、口腔がん、神経腫瘍、肝臓がん、大腸がん等多岐に渡る。研究対象自体の関連性は希薄であるが、研究内容は大きく新規標的分子の探索、抗がん剤感受性・耐性分子機構解析、バイオマーカーの開発を目的としたトランスレーショナルリサーチに分けられることから、研究内容に沿って3分野を設定し技術共有などでの連携を図った。各研究分野は、いずれもがんの個別化に向けた新規治療法・診断法を開発する上で欠くことのできない関連性の強い領域であり、これらを組織化することにより効率の良いがん研究基盤を形成することができた。

2. 前身の事業との差異の明確化

前身の本事業において、トランスレーショナルリサーチ領域の研究が少なく、研究成果の実現性についての問題点が指摘された。このことから、本プロジェクトにおいては、基礎領域においても各臨床教室と連携して、臨床材料を用いた検証に重点を置き、多くの研究が行われた。この結果、臨床応用の実現性の高い標的分子並びにバイオマーカーの候補分子を発見することができた。

<「中間評価時」に付された留意事項>

1. 評価制度の整備・適切な時期の外部評価
2. 若手育成の組織形成
3. 社会に向けての情報公開
4. 具体的な各科の連携

<「中間評価時」に付された留意事項への対応>

1. 評価制度の整備・適切な時期の外部評価に対する対応

研究報告会並びに研究報告書の提出を義務付け、自己評価並びに相互評価に努めた。また、最終年度に3名の外部評価委員に依頼し、書面による報告書の外部評価を受けた。この結果については、各研究室に通達し改善に努めた。

2. 若手育成の組織形成

本プロジェクト全体としての教育システムを構築することができなかったが、各教室での大学院生・学部学生への指導、ならびにがん領域の招聘講師・学内講師によるセミナーを毎年4回以上開催し若手育成のための教育に努めた。

3. 社会に向けての情報公開

本プロジェクトの内容については、多くの論文発表・学会発表を行って情報公開をおこなった。一般へ向けた情報公開については、各教室のホームページにおいて行った。

4. 具体的な各科の連携

上に示したように、医学部・歯学部・薬学部・研究所の各臨床、基礎教室が参画しており、研究対象自体の関連性は希薄であるが、各分野における技術共有や臨床材料・臨床情報の共有化により参加教室の連携は円滑に行われた。

添付①

評価体制

本プロジェクト参加研究室に対しては、研究報告会参加及び成果報告書の提出を義務付け、研究費分担金に見合った研究が行われているか相互評価を行った。外部評価委員を下記 3 名の諸先生方に委託し、終了年次に研究内容について外部評価を受けた。評価内容については、各参加教室に通達し、それぞれの研究テーマの改善に努めた。

金沢大学大学院医学系血液呼吸器内科学

金沢大学附属病院呼吸器内科

明治薬科大学 分析化学教室

近畿大学医学部ゲノム生物学講座

笠原 寿郎先生

鈴木 俊宏先生

西尾 和人先生

金沢大学大学院医学系血液呼吸器内科学

金沢大学附属病院呼吸器内科

笠原 寿郎

新たなパラダイムに基づく新規癌標的分子の探索については、どちらのテーマも極めて新規性が高く、臨床応用の可能性について着実な実証を重ねており、新しい切り口の悪性腫瘍治療法が開発されることが期待できる。特に接着斑分子である Hic-5 に関する研究は、がん組織の cancer associated fibroblast が新たな治療標的となる可能性を示した初めての事例であり、今後の発展が非常に期待される。がん個別化学療法を目指した抗がん剤感受性、耐性の分子機構の解析では、プロテオグリカン SDC-4 の TGF- β 誘導 EMT に関する解析は興味深い。課題である抗がん剤耐性の分子機構にどのように関与しているか証明していない。afatinib 耐性株における研究は着実な証明が行われており、これまで知られていない可逆的な耐性を含む分子機構の発見した点は評価できる。著者らが述べているように、今後臨床材料を用いた実臨床での証明が待たれる。抗がん剤抵抗性の TN 乳がんにおいて DNA 修復遺伝子である BRCA の機能不全 (BRCAness) が高率に認められるという、一見相反する現象に関する研究は興味深い。症例数が少なく網羅的遺伝子解析についても現象論にとどまっている感が否めない。個別化診断・有害事象予測におけるバイオマーカーの開発の研究については、総じてサンプル数が少なく、スクリーニングの域を出ていない。EGFR-TKI による間質性肺炎と薬物動態との関連性において、ABCG2 遺伝子多型の解析は興味深い。特異的な薬物体内動態が遺伝子多型によって誘導されるものか証明できておらず、更なる症例数の集積が待たれる。口腔がんの特性を反映するメチル化プロファイル、miRNA の網羅的解析についても、サンプル数が少なく、また抽出された因子がどのような分子機構でがんの悪性形

質に関与するか考察されていない。今後の展開の方向性が定まっていなように思われる。グリオブラストーマの増殖に対する PACAP の作用に関する研究は、新規性が高い研究と考えられるが、*in vitro*、*in vivo* の解析のみでの証明は不十分であり、臨床材料を用いた解析によって実際の脳腫瘍での発現解析が必要である。

明治薬科大学 分析化学教室

鈴木 俊宏

本プロジェクトにおいては、医・歯・薬学部を有する昭和大学の特徴を生かし、また基礎と臨床の研究者がバランスよく分担して、それぞれの目的に沿って高いレベルの研究成果が得られていることは高く評価できます。また、悪性腫瘍の個別化診断・治療法の開発に結び付けるべく、臨床材料を用いたトランスレーショナルリサーチを意識した研究が多く行われていました。しかしながら、各分担者間の有機的な結びつきは乏しく、研究基盤形成という意味では、テーマを絞った集学的アプローチ、もしくは全体の研究協力体制を重視した取り組みについても考慮されるべきと感じました

1. ミトコンドリア呼吸不全を基礎とする細胞悪性化形質誘導機構の解明と臨床応用の可能性

がん細胞の特性としてミトコンドリア DNA 遺伝子変異による呼吸鎖不全と、これと関連する細胞周期制御機構を探索しており、新規性また学術的な意義の高い研究です。臨床材料を用いた検証行われており、この方向性で新たな標的分子が発見できることに期待します。

2. 細胞接着斑分子を標的としたがん治療戦略の構築

接着斑分子 Hic-5 による stroma による腫瘍発生制御のメカニズムを詳細に解明しており、臨床応用の実現性が非常に高い研究です。Hic-5 を標的とした分子標的薬は、新たなカテゴリーのがん治療薬としての期待が大きく、今後の発展を強く望みます。

3. ヒト上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)の耐性機構およびその克服法の開発

Afatinib 耐性機構について新規分子機構を発見しており、この克服法の方向性についても示していることは評価できます。IGF-1 受容体を標的とした抗体薬の臨床試験は既に失敗に終わっていますが、IGF リガンド抗体がこれとどのように異なった有用性があるかについて、今後の展開に期待します。

4. 乳がんの個別化医療を目指して —特に治療抵抗性乳がんの分子的理解—

BRCAness を有する TN 乳がんに関する治療法開発のための臨床研究で、着目点は良いと思われませんが、症例数が少なく現時点で信憑性が問えません。網羅的遺伝子解析を行うのであれば、これでスクリーニングされた分子について基礎的な実証が行われることに期待します。

5. 非小細胞肺癌患者に対する EGFR-TKI エルロチニブおよびゲフィチニブによる間質性肺炎と薬物動態

著者らの結果からも、EGFR-TKIにより引き起こされる間質性肺炎が薬物動態のみに依存するものではないことは明らかですが、薬物輸送分子 ABCG2 の遺伝子多型解析によりある程度予想がつくことは意義が大きいと思います。本研究も症例数が少なく信憑性は問えませんが、今後の症例集積に期待します。

6. 口腔がんにおけるメチル化遺伝子、miRNA を用いた腫瘍マーカーによる早期診断法の開発

口腔扁平上皮がんのメチル化遺伝子プロファイリングにより悪性度を反映するクラスターが得られたことは意義が大きいと思います。これらの網羅的解析から抽出された因子の抽出方法が十分に記載されておらず、また検証もなされていないことから評価できませんが、これらによる早期診断・治療法の開発の意義は大きいと思います。

7. 培養ヒトグリオーマ細胞における PACAP および PACAP 受容体の発現と幹細胞マーカーとの相関性

PACAP のアストロサイトへの増殖効果の知見から、幹細胞マーカーを用いたグリオーマの悪性度と同分子による増殖に関する検討が行われています。マーカーで得られた悪性度の評価は一面的で、培養細胞株の性質を本当に反映しているか疑問です。また、PACAP のグリオーマに対する増殖効果は必ずしも高く見えず、研究のデザインとして臨床材料での検証が必要ないように感じました。

本研究は 5 年間の研究機関で実施されたものです。

分担研究テーマは様々ですが、全体テーマに則した研究内容です。幅広いがん腫を対象として、医学部、歯学部、薬学部、腫瘍分子生物学研究所のがん研究者がそれぞれの特徴を生かしながら、到達目標を共有し、連携しながら研究が進められています。特に、新たなパラダイムに基づく新規

癌標的分子の探索の分野では、創薬につながる可能性が具体的に示された標的分子が発見されており、本研究の大きな成果だと考えます。

また、その他の分野においても、乳がん、肺がん、口腔がん、神経腫瘍と多岐に渡るがん腫を対象に、それぞれ特色のある研究が進められ、がん分子標的治療の開発、バイオマーカーによる個別化の可能性が具体的に示唆される成果が得られています。

本研究報告書は最終報告ですが、研究の継続が望まれるとともに、ここで得られた成果が速やかに論文掲載等により公表されることが期待されます。

主要論文別刷り

