

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590317

研究課題名（和文） 膵癌に対する新しい分子標的治療

研究課題名（英文） Novel molecular target therapy for pancreatic cancer

研究代表者

仲田 文造（NAKATA BUNZO）

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60271178

研究成果の概要（和文）：Gemcitabine の膵癌に対する効果と deoxycytidine kinase 発現に正の相関を認めた。膵癌には HER2 および EGFR が高発現していることから、両者を標的とする lapatinib の効果が期待された。In vitro および in vivo の検討により lapatinib 単独、および、S-1 併用による強い抗腫瘍効果が認められた。Lapatinib の抗腫瘍効果は HER2 発現との相関が示唆された。

研究成果の概要（英文）：There was a positive correlation between the clinical efficacy by gemcitabine and the expression of deoxycytidine kinase in pancreatic cancer. The majority of pancreatic cancers showed overexpression of HER2 and/or EGFR. Consequently, lapatinib, a molecular targeting agent for both of HER2 and EGFR, may be effective for pancreatic cancer. In vitro and in vivo experimental results demonstrated the substantial anti-tumor effect for pancreatic cancer by lapatinib alone and combined with S-1. It was suggested that the anti-tumor effect of lapatinib was associated with HER2 expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：膵癌、DNA array、分子標的治療、代謝拮抗剤

1. 研究開始当初の背景

膵癌は本邦で、毎年2万人以上が新たに罹患し、ほぼ同数が死亡する、最も悪性度の高い腫瘍である。2004年度の統計では臓器別癌死亡数で第5位であり、決して稀な癌ではない。約6割は発見時に切除不能であり、切除例でもほとんどが2年以内に再発死亡し、5年生存率は10数%である。切除率は近年、わずかながら上

昇しているが、その外科治療成績はほとんど改善していない。

このような切除不能膵癌に対する治療、あるいは切除後の再発予防として、現在は代謝拮抗剤gemcitabine（GEM）投与が第1選択である。しかしGEMの治療成績は切除不能例で奏効率5-10%であり、生存中央値で6ヶ月弱である。これはGEM登場前の標準的治療薬であった5-F

U単独投与例の生存中央値をわずか1ヶ月ほど延長したに過ぎない。そこで米国を中心にGEM単独とGEM+5-FU、GEM+cisplatin、GEM+docetaxel、GEM+CPT-11を比較する第III相臨床試験が行われたが、これまでGEM単独より有意に延命効果のあったものはなかった。

最近、米国ではGEMに分子標的治療薬を併用する臨床試験が盛んに行われるようになった。血管新生阻害効果を示す抗VEGF抗体のbevacizumabをGEMに併用するレジメは第II相臨床試験で有望とされ、第III相試験が施行された。しかし、本併用療法は2006年6月にGEM単独と比較して有意な生存期間延長はなかったことが報告された。これまでのところ第III相臨床試験で唯一GEM単独より有意に生存期間が長いと報告されたのは、EGFR経路のtyrosine kinase阻害剤のerlotinibとGEMの併用である。しかし、その生存期間はGEM単独で5.9ヶ月、erlotinib + GEMで6.4ヶ月であり、その差はわずかであった。このように、膵癌に対する分子標的治療薬の中には、GEMと併用することで治療成績の向上が期待されるものがあることが明らかとなったが、さらなる新しい分子標的薬の開発が望まれる。このような状況に加えて、2006年8月よりは経口抗癌剤S-1が本邦で膵癌に対しても保険適応となり、今後はS-1と併用して有効な分子標的治療薬の開発も重要な研究課題となる。

2. 研究の目的

(1) 切除不能膵癌に対するGEM感受性関連遺伝子発現と予後の相関

膵癌の標準治療はGEMである。GEMの感受性に関与すると考えられる分子が基礎的実験により明らかにされている。本研究では膵癌の臨床検体を超音波内視鏡下穿刺 (EUS-FNA) により採取し、GEMの効果との相関を検討することで、GEMの感受性を予測する分子を見いだす。

(2) 膵癌に高発現する分子標的の探索

分子標的治療薬の標的分子となる物質の膵癌における発現率と、その標的分子発現と予後の関連を検討する。

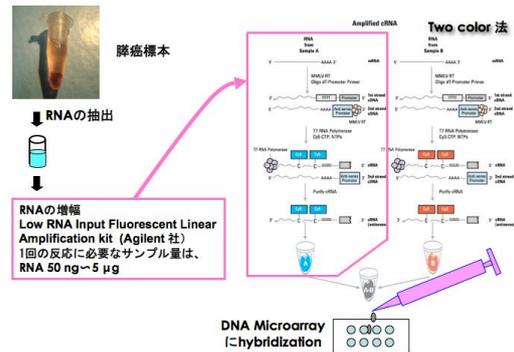
(3) 分子標的治療薬単独およびS-1との併用効果

膵癌にHER2およびEGFRが高発現していたことから、両者を標的分子とするチロシンキナーゼ阻害剤のlapatinibに着目した。in vitroの検討ではlapatinib単独のみならず、S-1との併用による効果も検討する。in vivoの検討においても単独およびS-1との併用による腫瘍増殖抑制効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 切除不能膵癌に対する GEM 感受性関連遺伝子発現と予後の相関

切除不能膵癌に対して、GEM投与前のEUS-FNA標本からRNAを抽出し、DNA microarrayを用いて標的分子の発現を検討した。GEM感受性に関連するとされるdeoxycytidine kinase (dCK), hENT1, hENT2, dCMP deaminase, cytidine deaminase, 5'-nucleotidase, RRM1, RRM2のmRNA発現量と生存期間との相関を検討した。



(2) 膵癌に高発現する分子標的の探索

膵癌におけるHER2およびEGFRの発現を検討した。教室で根治手術を施行した膵癌137例のパラフィン標本を対象に、それぞれの抗体を用いて免疫組織染色により検討した。判定は一般臨床で使用されているハーセプテストの判定基準に従った。染色結果と予後との相関を検討した。

(3) 分子標的治療薬単独およびS-1との併用効果

4種の膵癌培養細胞株 (MiaPaca-2、PANC-1、Capan-1、Capan-2) を用いて、分子標的治療薬 lapatinib の単独、および、S-1 との併用効果を MTT 法により測定した。至適用量の決定のために、種々の薬剤の濃度により検討した。なお、使用する膵癌細胞については flow cytometry により標的分子の蛋白発現量の測定を行い、lapatinib の効果との相関も検討した。さらにヌードマウスによる抗腫瘍効果の検討を行った。ヌードマウスには膵癌培養細胞を用いて皮下に xenograft を作成し、lapatinib 単独、および、S-1 との併用効果を腫瘍の大きさの計測により判定した。

4. 研究成果

(1) 切除不能膵癌に対するGEM感受性関連遺伝子発現と予後の相関

GEMを2コース以上施行し、効果が判定できた35例 (Table 1) について解析した。

Table 1: Clinical characteristics of patients receiving GEM monotherapy.

Number of patients	35
Age (y) Mean ± SD (Range)	61.3 ± 8.5 (46-77)
Gender Male : Female	16:19
Location	
Head	7
Body/tail	28
Follow-up time from commencement of GEM monotherapy (mo) Median (Range)	7.7 (3.0 - 21.4)
Number of courses of GEM monotherapy Mean ± SD (Range)	5.9 ± 4.0 (2-16)
GEM efficacy	
Effective*	12
Non-effective	23

GEM, gemcitabine

*Effective, partial response by imaging study or stable disease by imaging study with 50% or more decrease in tumor markers compared to pretreatment values

dCKのみが効果と相関した (Table 2)。dCK発現を高める分子標的治療薬をGEMに併用することで相乗効果が期待されると考えられた。

Table 2: Correlation between gene expression and GEM efficacy in patients with pancreatic cancer receiving GEM monotherapy.

Gene expression*		GEM efficacy		P [†] -value
		Effective [‡]	Non-effective	
hENT1	High	4	9	>0.9999
	Low	8	14	
hENT2	High	6	9	0.5374
	Low	6	14	
dCK	High	8	7	0.0398
	Low	4	16	
DCD	High	3	9	0.4765
	Low	9	14	
CDA	High	4	9	0.9999
	Low	8	14	
5'-NT	High	4	12	0.2882
	Low	8	11	
RRM1	High	4	8	>0.9999
	Low	8	15	
RRM2	High	4	8	>0.9999
	Low	8	15	

GEM, gemcitabine

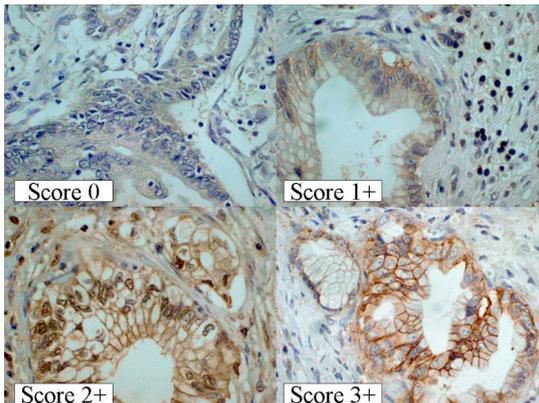
*Gene expression was determined as high or low based on mean values of 35 EUS-FNA samples.

[‡]Effective, partial response by imaging study or stable disease by imaging study with 50% or more decrease in tumor markers compared to pretreatment value

[†]P, examined by chi-squared test (Fisher's exact test)

(2) 膵癌に高発現する分子標的の探索

EGFR、HER2のいずれも陽性例では細胞膜に発現した。以下に、各スコアの代表例を示す。



膵癌の70%にEGFRまたはHER2が発現していた (Table 3)。

Table 3. Distribution of HER2 and EGFR expressions detected by immunohistochemistry in 137 resected pancreatic cancers

	Number	Percentage
HER2+ EGFR+	48	35.0%
HER2+ EGFR-	38	27.7%
HER2- EGFR+	10	7.3%
HER2- EGFR-	41	30.0%

EGFR発現と予後との関連は認めなかった。HER2発現については単変量解析、多変量解析のいずれにおいても有意な予後因子であることが示された (Figure 1、Table 4)。

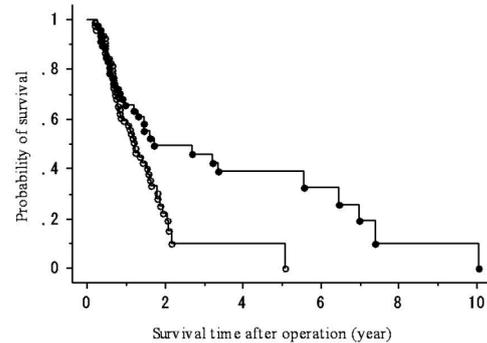


Figure 1. HER2発現による予後の相違 (P=0.0078) を示すKaplan-Meier曲線。●はHER2陰性、○はHER2陽性。

Table 4. Multivariate survival analyses in resectable pancreatic cancer

Variable	Comparison	Hazard ratio	P-value	95% CI
HER2 expression	Positive : Negative	1.806	0.0258	1.074-3.036
Tumor location	Head/whole ; body/tail	1.232	0.4516	0.715-2.123
Tumor size	>2cm ; ≤ 2cm	1.297	0.4464	0.664-2.536
Tumor differentiation	G3/4 ; G1/2	1.009	0.9781	0.540-1.885
T category	T3/4 ; T1/2	2.493	0.0188	1.163-5.341
N category	N1 ; N0	1.04	0.8714	0.650-1.663

P-values were examined by the Cox proportional hazard model.

CI, confidence interval.

Tumor differentiation is according to Digestive System Tumors Classification of the World Health Organization (WHO 2000). TNM classification is according to the International Union against Cancer (UICC 2002).

(3) 分子標的治療薬単独およびS-1との併用効果

4種の膵癌細胞株を用いて、lapatinib単独およびS-1併用による効果を検討した。抗腫瘍効果はMTT assayにより行い、併用効果は解析ソフトCalcuSyn 2.0を用いたMedian Effect Analysisのcombination index (CI)で評価した。CI=1ならば相加的であり、CI<1.0は相乗的であるがCIの値が小さいほど相乗効果が強いと考えられる。CI>1.0であれば2剤併用は拮抗的と評価される。LapatinibとS-1併用では検討した4細胞株全てで相乗効果が示され、CI値は0.310-0.643であった (Figure 2)。

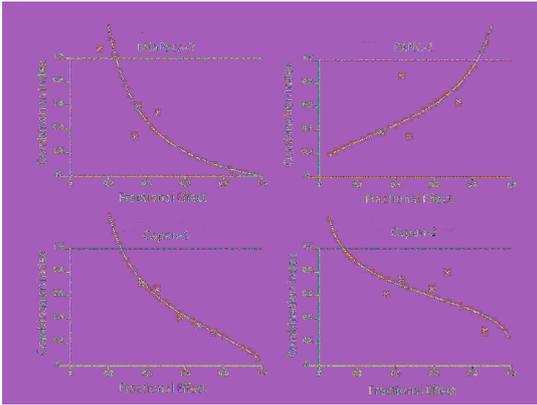


Figure 2. Median Effect Analysis

ヌードマウスに各膵癌培養細胞のxenograftを作成し、これにS-1単独、lapatinib単独、S-1+lapatinib単独（いずれも週5日、経口投与）した。全ての細胞においてlapatinib単独でも腫瘍増殖抑制効果を認めた（非投与に比べた腫瘍の大きさが27-58%）。また、MiaPaca-2とPANC-1においては併用により相乗的効果を認めた（Figure 3）。

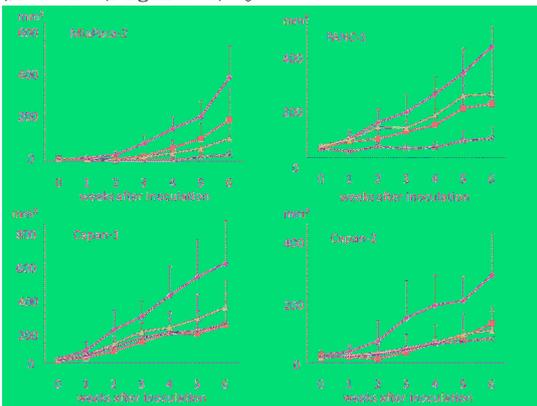


Figure 3. ヌードマウスに作成した xenograft の腫瘍径の相違。◆はコントロール（薬剤投与なし）、■はS-1（10 mg/kg）週5回投与、▲はlapatinib（30 mg/kg）週5回投与、×はS-1（10 mg/kg）+lapatinib（30 mg/kg）週5回投与。

細胞株のHER2 蛋白発現とヌードマウスの xenograft に対する lapatinib 単独による腫瘍増殖抑制率は相関する傾向が認められた（ $r=0.935$, $P=0.065$ ）。しかし、EGFR 蛋白発現とは相関しなかった（ $r=0.315$, $P=0.685$ ）（Figure 4）。

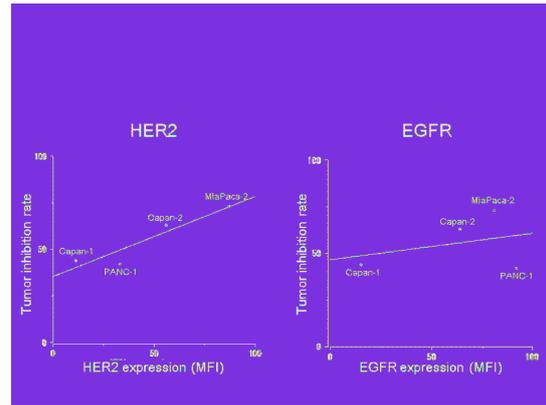


Figure 4. 標的分子発現とヌードマウス xenograft 抑制効果の相関

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計3件）

- ① Masahiro Komoto、Bunzo Nakata、et al、*In vitro* and *in vivo* evidence that a combination of lapatinib plus S-1 is a promising treatment for pancreatic cancer、*Cancer Science*、査読有、101 巻、2010、468-473
- ② Reiko Ashida、Bunzo Nakata、et al、Gemcitabine sensitivity-related mRNA expression in endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy of unresectable pancreatic cancer、*Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*、査読有、28 巻、2010、83（7 ページ）
- ③ Masahiro Komoto、Bunzo Nakata、et al、HER2 overexpression correlates with survival after curative resection of pancreatic cancer *Cancer Science*、査読有、100 巻、2009、1243-1247

〔学会発表〕（計8件）

- ① 仲田文造、他、膵癌に対する分子標的治療薬 lapatinib と S-1 併用の抗腫瘍効果、第8回日本臨床腫瘍学会学術集会、2010年3月18日、東京
- ② 仲田文造、他、膵癌に対する新しい分子標的治療 lapatinib の抗腫瘍効果の検討、第47回日本癌治療学会学術集会、2009年10月24日、横浜
- ③ 河本真大、仲田文造、他、膵癌に対する S-1+lapatinib 併用療法の基礎的検討、第64回日本消化器外科学会総会、2009年7月16日、大阪
- ④ 仲田文造、他、超音波内視鏡下生検（EUS-FNA）標本の Focused DNA array（FDA）解析による切除不能膵癌の gemcitabine 感受性予測、第74回日本消化器

- 内視鏡学会総会、2007年10月21日、神戸
- ⑤ Bunzo Nakata, et al, hENT-1 and hENT-2 expression in tumor obtained by EUS-FNA may predict the efficacy of gemcitabine for unresectable pancreatic cancer, Asian Pacific Digestive Week 2007、2007年10月16日、神戸
 - ⑥ Bunzo Nakata, et al, Gene analysis relating to chemotherapeutic sensitivity using unresectable pancreatic cancer tissue obtained by EUS-FNA, 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association、2007年10月4日、横浜
 - ⑦ 仲田文造、他、膵癌における遺伝子発現の超音波内視鏡下穿刺および切除検体を用いた解析、第38回日本膵臓学会大会、2007年6月28日、福岡
 - ⑧ 仲田文造、他、膵癌切除標本および超音波内視鏡下穿刺吸引生検（EUS-FNAB）の遺伝子解析、第107回日本外科学会定期学術集会、2007年4月13日、大阪

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：膵癌に対するラパチニブと TS-1 の併用療法

発明者：仲田文造

権利者：仲田文造

種類：特許出願

番号：20902230055

出願年月日：2009年11月30日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲田 文造 (NAKATA BUNZO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60271178

(2) 研究分担者

八代 正和 (YASHIRO MASAKAZU)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60305638