

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700929

研究課題名（和文） PI3K パスウェイデータベース構築に基づく PI3K を標的としたがん治療戦略

研究課題名（英文） Development of PI3K pathway activation status and its application for predicting therapeutic efficacies of PI3-kinase inhibitors

研究代表者

旦 慎吾（DAN SHINGO）

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター分子薬理部・主任研究員

研究者番号：70332202

研究成果の概要（和文）：

本研究では、当研究室で開発された PI3K 阻害剤 ZSTK474 の効果予測バイオマーカーを探索するために、39 種類のヒトがん細胞株（JFCR39）について、種々のシグナル伝達分子の活性化状態を調べるとともに、種々の PI3K 阻害剤の感受性を測定してデータベース化し、両者の関連を調べた。その結果、リン酸化 Akt を高発現しているがん細胞は概して PI3K 阻害剤が効きやすく、KRAS/BRAF 遺伝子に変異があるがん細胞は逆に効きにくいという相関を見出した。これらの相関は *in vivo* でも確認されたことから、PI3K 阻害剤の効果予測マーカーとして臨床応用されることが期待された。

研究成果の概要（英文）：

To explore diagnostic biomarkers for predicting the efficacy of PI3K inhibitors including ZSTK474 that we developed previously, we examined the pathway activation status and the efficacy of PI3K inhibitors in a panel of 39 human cancer cell lines (JFCR39), and constructed an integrated database (DB). Using this DB, we found phospho-Akt and KRAS/BRAF mutation prominently correlated with the efficacy and the inefficacy of PI3K inhibitors, respectively. These correlations were confirmed in human tumor xenografts *in vivo*, suggesting that they could serve as predictive biomarkers in future clinical trials.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：分子標的治療・癌・抗がん剤・PI3K・データベース・バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景  
 ホスファチジルイノシトール-3 キナーゼ  
 (PI3K) 経路は、がんにおいて PIK3CA 遺

伝子の機能獲得型変異や PTEN の機能不全により高頻度に活性化されていることから、がんの有望な分子標的と考えられている。当

研究室ではこれまでに、低毒性かつ *in vivo* で優れた抗腫瘍活性を示す PI3K を標的とした新規抗がん剤 ZSTK474 を開発した。本剤は現在、アメリカで臨床試験が行われている。

分子標的抗がん剤の開発には、薬自体の開発と並行して薬の効果を予測するためのバイオマーカーの開発が求められる。しかしながら、ZSTK474 をはじめ臨床開発中の PI3K 阻害剤についてはそのようなバイオマーカーは見出されていない。本剤を用いたより効果的ながん治療を実現するためには、薬効予測バイオマーカーの同定は急務である。

## 2. 研究の目的

ZSTK474 をはじめとした PI3K 阻害剤の効果を予測するバイオマーカー候補を見出し、臨床に提案する。

## 3. 研究の方法

39 種類のヒトがん細胞パネル (JFCR39) をモデルに、PI3K 経路および Ras-MAPK 経路の異常と PI3K 阻害剤の効果との関連を解析し、これらの中からバイオマーカーとなるものを同定する。具体的には、PI3K 経路の活性化に関わる PIK3CA・PTEN 遺伝子の変異・欠失、Ras-MAPK 経路の活性化に関わる KRAS・BRAF 遺伝子の変異を調べるとともに、Akt や MAPK などの各々の経路の下流因子の活性化状態を抗リン酸化タンパク質特異的抗体を用いたウェスタンブロットにて網羅的に測定する。また、JFCR39 について、ZSTK474 を含む種々の PI3K 経路阻害剤に対する感受性を測定する。これらの情報をすべて統合してデータベース (DB) 化し、この DB を利用して、PI3K 阻害剤の感受性と有意な相関を示すパスウェイ因子を同定する。同定した因子については、*in vivo* での相関を検討するために、ヌードマウス皮下に移植した 24 種類のヒトがん細胞 (JFCR24 ゼノグラフト) に対する ZSTK474 の有効性と *in vivo* サンプルにおける発現を比較する。*in vivo* でのタンパク質発現解析が簡便に行われるように、組織マイクロアレイ (TMA) を作成する。

## 4. 研究成果

DB 解析の結果、意外なことに、PIK3CA や PTEN の遺伝子異常を持つがん細胞がこれらの遺伝子が正常のがん細胞に比べて PI3K 阻害剤が効きやすいという有意な関連は認められなかった。一方、リン酸化 Akt を高発現しているがん細胞は PI3K 阻害剤が効きやすく、KRAS/BRAF 遺伝子に変異があるがん細胞は PI3K 阻害剤が効きにくいという相関を見出した。これらについては、*in vivo* サンプルを用いても同様な相関を認めた (リン酸化 Akt については、腫瘍組織のウェスタンブ

ロットおよび TMA を用いた免疫組織化学法の両方で ZSTK474 の有効性との関連が確認された)。以上のことから、これらの分子は、ZSTK474 の効果予測マーカーとして臨床応用されることが期待された。

## 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 4 件)

1. Dan S, Okamura M, Mukai Y, Yoshimi H, Inoue Y, Hanyu A, Sakaue-Sawano A, Imamura T, Miyawaki A, Yamori T. ZSTK474, a specific phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, induces G1 arrest of the cell cycle *in vivo*. *Eur J Cancer*. 2012;48(6):936-943.
2. Anzai K, Sekine-Suzuki E, Ueno M, Okamura M, Yoshimi H, Dan S, Yaguchi S, Enami J, Yamori T, Okayasu R. Effectiveness of combined treatment using X-rays and a phosphoinositide 3-kinase inhibitor, ZSTK474, on proliferation of HeLa cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Sci*. 2011;102(6):1176-1180.
3. Kong D, Dan S, Yamazaki K, Yamori T. Inhibition profiles of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors against PI3K superfamily and human cancer cell line panel JFCR39. *Eur J Cancer*. 2010;46(6):1111-1121.
4. Dan S, Okamura M, Seki M, Yamazaki K, Sugita H, Okui M, Mukai Y, Nishimura H, Asaka R, Nomura K, Ishikawa Y, Yamori T. Correlating phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor efficacy with signaling pathway status: *in silico* and biological

evaluations. *Cancer Res.* 2010;70(12):4982-4994.

[学会発表] (計 18 件)

1. 中村直起、且慎吾、西村由美子、磯山翔、梶原玄誠、矢守隆夫. ZSTK474 耐性を克服する併用薬の同定. 日本薬学会 第 132 年会. 2012/3/28-31 (札幌)
2. 梶原玄誠、西村由美子、且慎吾、矢守隆夫. ZSTK474 長期間暴露による PI3K 阻害剤耐性の誘導. 第 70 回 日本癌学会. 2011/10/3-5 (名古屋)
3. 且慎吾. PI3K/Akt/mTOR 経路の概略、PI3K 阻害剤. 第 9 回 日本臨床腫瘍学会. 2011/7/21-23 (横浜)
4. 関根絵美子、安西和紀、岡村睦美、吉見直、且慎吾、矢口信一、榎並淳平、矢守隆夫、岡安隆一. 癌細胞における PI3K 阻害剤 ZSTK474 と放射線との併用効果の研究. 第 15 回 日本がん分子標的学会. 2011/6/22-25 (東京)
5. 岡村睦美、且慎吾、吉見直、井上靖道、今村健志、矢守隆夫. PI3K 阻害剤 ZSTK474 による *in vivo* G1 アレストの可視化. 第 15 回 日本がん分子標的学会. 2011/6/22-25 (東京)
6. 且慎吾、岡村睦美、矢守隆夫. *Cancer Cell Informatics* を用いた PI3K 阻害剤の効果予測バイオマーカーの探索. 第 15 回 日本がん分子標的学会. 2011/6/22-25 (東京)
7. 且慎吾、岡村睦美、関万里子、山崎佳波、向井由美子、矢守隆夫. *In vitro* and *in vivo* evaluations of correlation between the activation status of signaling pathways and the efficacy of anticancer compounds in a panel of JFCR39 human cancer cell lines. AACR Annual Meeting. 2011/4/2-6 (USA・フロリダ)
8. 且慎吾. 未来の分子標的薬はどうやって作られる? がんプロ新潟セミナー. 2011/3/5 (新潟)
9. 矢守隆夫、且慎吾、岡村睦美、向井由美子、吉見直、井上靖道、羽生亜紀、坂上-沢野朝子、今村健志、宮脇敦史. *In vivo* visualization of G1 arrest of the cell cycle induced by a specific PI-3 kinase inhibitor in human tumor xenografts. Keystone Symposium "PI3-Kinase Signaling Pathways". 2011/2/13-18 (USA・ボストン)
10. 且慎吾、岡村睦美、関万里子、山崎佳波、向井由美子、矢守隆夫. *In silico* and biological evaluations of correlation between the activation status of signaling pathways and the efficacy of anticancer compounds in a panel of JFCR39 human cancer cell lines. Keystone Symposium "PI3-Kinase Signaling Pathways". 2011/2/13-18 (USA・ボストン)
11. 且慎吾、岡村睦美、関万里子、山崎佳波、奥井理予、向井由美子、西村裕之、石川雄一、矢守隆夫. *In silico* and biological evaluation of correlation between efficacy of PI3K inhibitors with the activation status of signaling pathways in a panel of JFCR39 human cancer cell lines. EORTC-NCI-AACR シンポジウム. 2010/11/16-19(ドイツ・ベルリン)
12. 且慎吾、岡村睦美、向井由美子、吉見直、井上靖道、羽生亜紀、今村健志、矢守隆夫. PIK3CA/PTEN 異常がんにおける PI3K 阻害剤による G0/G1 アレストの誘導. 第 69 回 日本癌学会. 2010/9/22-24 (大阪)
13. 且慎吾、矢守隆夫. がん細胞パネルに立脚したバイオロジーとインフォマティクスの連

携による PI3K 阻害剤の分子薬理解明(奨励賞). 第 69 回 日本癌学会. 2010/9/22-24 (大阪)

14. 山崎佳波、旦慎吾、矢守隆夫. ヒトがん細胞パネル JFCR39 を用いた PI3K パスウェイ阻害剤の in silico 機能評価. 第 69 回 日本癌学会. 2010/9/22-24 (大阪)
15. 向井由美子、旦慎吾、岡村睦美、井上靖道、羽生亜紀、今村健志、矢守隆夫. PI3K 阻害剤による G0/G1 アレストの誘導～in vitro での評価～. 第 69 回 日本癌学会. 2010/9/22-24 (大阪)
16. 岡村睦美、旦慎吾、向井由美子、吉見直、井上靖道、羽生亜紀、今村健志、矢守隆夫. PI3K 阻害剤による G0/G1 アレストの誘導～in vivo での評価～. 第 69 回 日本癌学会. 2010/9/22-24 (大阪)
17. 旦慎吾、向井由美子、井上靖道、今村健志、矢守隆夫. PIK3CA・PTEN 変異がんに対する ZSTK474 の G0/G1 アレストを介した抗がん効果. 第 14 回 日本がん分子標的学会. 2010/7/6-8(東京)
18. 旦慎吾、岡村睦美、吉見直、向井由美子、山崎佳波、井上靖道、羽生亜紀、今村健志、坂上(沢野)朝子、宮脇敦史、矢守隆夫. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase suppressed growth cancer cells with PIK3CA mutations or loss of PTEN expression via G0/G1 arrest of cell cycle but not apoptosis. AACR Annual Meeting. 2010/4/17-21(USA・ワシントン)

[図書] (計 2 件)

1. 旦慎吾、矢守隆夫. PI3K-Akt-mTOR 経路とその阻害剤. がん分子標的治療. 2012;10(2):101-109.
2. 旦慎吾、矢守隆夫. PI3K/mTOR 経路阻害薬 (西尾和人編「がん分子標的薬治療の現状と展望」2541-2547/2750 ページ).

東京: ライフ・サイエンス; 2011.

[産業財産権]  
○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
旦慎吾 (DAN Shingo)  
公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター分子薬理部・主任研究員  
研究者番号: 70332202

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし