

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590640

研究課題名(和文) プロテオーム、メタボローム解析による抗がん薬至適投与方法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the optimal administration method for anticancer agents by proteomics and metabolomics

研究代表者

南 博信 (Minami, Hironobu)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60450574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌の術前パクリタキセル毎週投与の効果・副作用と相関する因子を、治療前および初回投与6-8日後の血漿をプロテオーム解析することにより探索した。20例中4例でgood PR以上の効果が、9例でgrade 2以上の末梢神経障害がみられた。奏効例と非奏効例で最も差を認めたのはFibulin-1であった。末梢神経障害と最も相関したのはDynein heavy chain 7で、低値ほど神経障害を起こしやすく、神経障害を起こした7例中5例で治療開始後に上昇していた。また、Fibulin-1は末梢神経障害とも有意に相関していた。プロテオーム解析はバイオマーカー探索に有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Proteomics was investigated to identify proteins which were associated with efficacy and toxicities of the primary systemic chemotherapy with weekly paclitaxel in patients with early breast cancer. Paclitaxel was given at 80 mg/m², and plasma was obtained before the treatment and 6-8 days after the first administration of paclitaxel. Toxicities were monitored weekly. Among 20 patients, good PR was achieved in 4 and grade 2 or greater peripheral neuropathy was observed in 9. The greatest difference between responders and non-responders was observed in concentrations of Fibulin-1, and Dynein heavy chain 7 showed the greatest correlation to peripheral neuropathy. Patients with a lower concentration of Dynein heavy chain 7 was associated with a higher risk of peripheral neuropathy, and its concentration was increased after the start of the treatment in 5 of 7 patients who experienced neuropathy. Fibulin-1 was also significantly associated with peripheral neuropathy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：乳がん 化学療法 末梢神経毒性 抗腫瘍効果 プロテオーム解析 パクリタキセル

1. 研究開始当初の背景

抗腫瘍薬の効果を投与前に予測することは極めて困難である。また抗腫瘍薬の毒性は患者のQOLを低下させるのみならず、時に生命を脅かすまでに重篤化する場合もある。そのため抗腫瘍薬の効果や毒性を事前に予測し個別化投与を実現することは、今日のがん診療において最も重要な課題といえる。

抗腫瘍薬の効果の予測に関しては、近年遺伝子の網羅的解析法の有用性が盛んに検討されている。例えば c-DNA microarray を用いた腫瘍遺伝子の網羅的解析から、当該薬物の抗腫瘍効果を予測しようとするアプローチがある。Chang らは、24 例の docetaxel による術前治療を受けた乳がん患者から腫瘍組織 RNA を抽出し、c-DNA microarray を用いて解析した結果、docetaxel の抗腫瘍効果と相関する 92 個の遺伝子セットを見出し、奏効した 11 例中 10 例 (特異度、90%)、奏効しなかった 13 例中 11 例 (感度、85%) がこのセットを用いて正しく層別可能であった。同様に Iwao-Koizumi らは、44 例の docetaxel による治療を受けた乳がん患者の治療前腫瘍サンプルについて、high-throughput RT-PCR 技術を用いて、遺伝子を網羅的に解析し、約 2400 の遺伝子の中から、抗腫瘍効果を予測する 85 個の遺伝子セットを見出し、精度は 80% 以上であった。このような遺伝子の網羅的解析法については更なる前向き研究での評価が必要であり、現時点ではその臨床的有用性は未知数であるといえる。

このように c-DNA microarray など遺伝子の網羅的解析については、個別化治療においてに評価されつつある。しかしながら、遺伝子の発現レベル解析における最大の限界は、その産物たるタンパクの発現が翻訳・分解などの影響により必ずしも遺伝子レベルの発現とは一致しないことである。そういった観点から、遺伝子レベルではなくタンパクレベルでの網羅的解析法(プロテオミクス)が、個別化治療に応用しうる技術として注目されている。一方、タンパクが機能した結果として各種代謝物を網羅的に解析するメタボロミクスの手法も生理機能および薬理作用を捕らえる手法として応用されつつあるが、日内変動を伴う代謝を担がん患者でメタボロミクスを用いて評価する最適な方法は確立していない。

2. 研究の目的

(1)本研究では主としてプロテオームなどの Omics の解析手法により抗がん薬の効果および毒性のバイオマーカーを同定することを目的とする。具体的には本研究では様々ながんの効果を示し乳がんでは key drug の一つとして汎用されるものの、末梢神経障害により十分な治療が継続できなくなることが多いパクリタキセルを対象とする。乳がんの術前治療としてパクリタキセルの毎週投与を行う際に治療前および初回投与 6-8 日後の血漿を用い、プロテオーム解析およびメタボローム解析によりタンパクおよび代謝産物を

網羅的に解析し、臨床的效果、病理学的効果、および末梢神経障害と相関するタンパク、代謝産物を同定する。将来は別のサンプルセットでこれらを検証し、パクリタキセルの個別化治療の確立を目指す。

(2)担がん患者でメタボロミクスの最適な評価方法を探索するために、膀胱がん高率に合併する悪液質の血清マーカーを探索する。併せて、メタボロミクスの日内変動も評価する。

3. 研究の方法

(1)倫理委員会の承認を受けた臨床研究として 12 回のパクリタキセルの毎週投与を乳がんの術前化学療法として実施した。治療前および初回投与後 6~8 日目の血漿のプロテオームおよびメタボロームを解析し、腫瘍縮小効果、病理学的効果、末梢神経障害などの副作用と相関するタンパクを同定した。プロテオーム解析は株式会社メディカル・プロテオスコープ社が開発した多次元液体クロマトグラフィーと質量分析を組み合わせた複合システムを用いた。有意な代謝産物の同定には多変量解析を用い、薬物反応性(効果、副作用)と、治療前および初回投与後 6~8 日目の血漿のプロテオームおよびメタボロームとの相関を検討した。また、治療前と初回投与 6~8 日目の解析結果の変化と薬物反応性との相関も検討した。

乳がんの術前治療としてパクリタキセル 80 mg/m² を 1 週毎に合計 12 回投与による治療を受けた患者で、本研究への参加に同意が得られた患者を対象として、パクリタキセル初回投与前 14 日以内、および初回投与 6-8 日後 (2 回目投与前)に採血を行い血漿サンプルを分離し、-80 で凍結保存した。パクリタキセル毎週投与に引き続き doxorubicin と cyclophosphamide (AC 療法)を 3 週ごとに 4 回投与し、その後手術を施行した。パクリタキセル投与中は血液毒性や末梢神経毒性などの副作用を毎週評価し、抗腫瘍効果はパクリタキセル終了後 AC 療法開始前、および AC 療法後手術前に触診および超音波検査で評価した。また切除標本で病理学的効果を評価した。

各被験者の年齢、合併症などの患者背景因子、腫瘍の組織型や免疫組織染色などの病理学的特長、臨床的腫瘍縮小効果、病理学的効果、末梢神経障害の最悪グレード、治療完遂の有無などの臨床・病理学的特長とプロテオーム解析で同定されたタンパクとの相関を統計学的に解析した。

プロテオーム解析では SELDI-TOF/MS 法が一般的に用いられている。この方法は微量サンプルでの解析が可能でタンパク発現をパターン認識する方法であるが、得られたシグナルのタンパクを同定することは困難である。抗腫瘍効果や副作用と相関するタンパクを同定することは、結果の妥当性の検証や診断キットの開発を可能とし、耐性克服薬、

毒性に対する支持療法薬、新規抗腫瘍薬の開発に繋がる。したがって我々はタンパクの単なるパターン解析ではなく、タンパクの同定までを可能にする株式会社メディカル・プロテオスコープ社が開発した多次元液体クロマトグラフィーと質量分析計を組み合わせた複合システムを採用した。

血漿検体を各種前処理した後に、ペプチド混合物試料を液体クロマトグラフィーにて分離し、質量分析にてペプチドイオンの検出・分子量測定を行い、タンデム質量分析にてペプチドフラグメントイオンを取得した。ペプチドイオンとそのフラグメントイオンの質量スペクトラムからタンパクを同定した。臨床病理学的特徴との相関解析においては、臨床的奏効例と非奏効例、病理学的奏効例と非奏効例、グレード2以上の末梢神経障害発現例と非発現例、など臨床的評価指標により被験者をグループ分けし、グループ間で差がみられるタンパクに着目して解析した。プロテオーム解析結果の比較定量検討は、メディカル・プロテオスコープ社が開発した解析データ処理プログラム i-OPAL などを用いた。

(2) 倫理委員会の承認を受けた臨床研究として、悪液質を伴う進行膵がん患者と伴わない進行膵がん患者において6:30、11:30、16:30、21:30に採血を行い、メタボロミクスを解析した。4週以内の手術、2週間以内の放射線療法、あるいは1週間以内の化学療法を受けている患者は除外した。悪液質は performance status (PS)が1-4、Grade 1-4の食欲低下、および6ヶ月で10%以上の体重減少を伴っている患者を悪液質ありとし、PSが0-2で食欲低下はGrade 1以下、血清アルブミン 3.5 g/dL以上かつ6ヶ月間の体重減少が5%未満の患者を悪液質なしとした。検体を前処置の後にGS/MSによりメタボローム解析を行った。

4. 研究成果

(1)術前化学療法として12回のパクリタキセルの毎週投与を実施し、治療前および初回投与後6~8日目の血漿サンプルを解析できた20名の乳癌患者を対象とした。20例の閉経状態は9例が閉経前、11例が閉経後で、T因子はT2、T3、T4がそれぞれ13、5、2例、N因子はN1が18例でN0が2例、エストロゲン受容体は11例で陽性、9例が陰性で、HER2は5例で陽性、15例で陰性であった。20例のうち4例がgood partial response (PR)以上の効果が得られ、2例でprogressive disease (PD)であった。末梢神経障害はgrade 2が8例でみられgrade 3は1例で出現した。

治療開始前と初回パクリタキセル投与6~8日目の保存血漿を用いてショットガンプロテオーム解析を行った。各サンプル3回ずつ測定し、合計120測定を実施した。Good PR以上の奏効例と非奏効例、Grade 2以上の末梢神経障害発現例と非発現例で比較することにより、パクリタキセルの効果あるいは末梢

神経障害と関連する因子の同定を試みた。

その結果、治療開始前の10種の血漿タンパクおよび治療開始後の8種の血漿タンパクの濃度に奏効例と非奏効例で有意な差($p<0.05$)を認めた。また、4種のタンパクの治療前後の濃度変化が奏効と関連していた。最も統計学的に差を認めたのは治療開始前のFibulin-1 ($p=0.0004$)であったが、これは腫瘍縮小率との相関解析で同定された8種類には含まれていなかった。

一方、末梢神経毒性との相関解析においては、8種の治療前のタンパク、4種の治療開始後のタンパク、5種のタンパクの治療開始前後の濃度変化が末梢神経障害発現と関連していた。最も統計学的優位性が高かったのは軸策輸送に関連すると考えられるDynein heavy chain 7 (axonemal)であり、これが治療前に低濃度であると神経障害を起こしやすかった。また、末梢神経障害をきたした7例中5例で治療開始後に上昇していた。また、抗腫瘍効果の解析で同定されたFibulin-1が末梢神経障害の解析においても有意な因子として同定された。

プロテオーム解析は抗悪性腫瘍薬の効果および毒性と関連するバイオマーカーを同定するのに有用な方法であることが示唆された。

(2)膵がんのメタボローム解析では悪液質を伴う患者9例、伴わない患者12例を解析した。前治療歴を有するのはそれぞれの群で1例のみであった。6ヶ月間の体重減少は悪液質群で13.4%、非悪液質群で2.5%であった。悪液質群では血清IL-6、TNF- α が高く、レプチンが低値を示す傾向を認めた。メタボロミクス解析で両群間に差を認めたのは、catechol, paraxanthine, valine, proline, p-hydroxybenzoic acidであった。特にparaxanthineが悪液質群で顕著に低下していた。また、これらの代謝物には日内変動が観察され、メタボローム解析では日内変動に留意し採血時刻を統一する必要があることが示された。

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8件)

Tanioka M, Sasaki M, Shimomura A, Fujishima M, Doi M, Matsuura K, Sakuma T, Yoshimura K, Saeki T, Ohara M, Tsurutani J, Watatani M, Takano T, Kawabata H, Mukai H, Naito Y, Hirokaga K, Takao S, Minami H. Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy in HER2-overexpressing breast cancer according to hormonal receptor status. Breast(Epub),2014
DOI:10.1016/j.breast.2014.03.008 (査読有)

Seruga B, Sadikov A, Cazap EL, Delgado

LB, Digumarti R, Leighl NB, Meshref MM, Minami H, Robinson E, Yamaguchi NH, Pyle D, Cufer T. Barriers and challenges to global clinical cancer research. *Oncologist* 19(1):61-7, 2014 (査読有)

Funakoshi Y, Mukohara T, Tomioka H, Ekyalongo RC, Kataoka Y, Inui Y, Kawamori Y, Toyoda M, Kiyota N, Fujiwara Y, Minami H. Excessive MET signaling causes acquired resistance and addiction to MET inhibitors in the MKN45 gastric cancer cell line. *Invest New Drugs* 31 (5): 1158-68, 2013 (査読有)

Kobayashi T, Nishiumi S, Ikeda A, Yoshie T, Sakai A, Matsubara A, Izumi Y, Tsumura H, Tsuda M, Nishisaki H, Hayashi N, Kawano S, Fujiwara Y, Minami H, Takenawa T, Azuma T, Yoshida M. A novel serum metabolomics-based diagnostic approach to pancreatic cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 22: 571-579, 2013 (査読有)

Ekyalongo RC, Mukohara T, Kataoka Y, Kiyota N, Fujiwara Y, Minami H. Mechanisms of acquired resistance to insulin-like growth factor 1 receptor inhibitor in MCF-7 breast cancer cell line. *Invest New Drugs* 31: 293-303, 2013 (査読有)

Tomioka H, Mukohara T, Kataoka Y, Ekyalongo RC, Funakoshi Y, Imai Y, Kiyota N, Fujiwara Y, Minami H. Inhibition of the mTOR/S6K signal is necessary to enhance fluorouracil-induced apoptosis in gastric cancer cells with *HER2* amplification. *Int J Oncol* 41: 551-558, 2012 (査読有)

Mukohara T, Nagai S, Mukai H, Namiki M, Minami H. Eribulin mesylate in patients with refractory cancers: a phase I study. *Invest New Drugs* 30 (5): 1926-1933, 2012 (査読有)

Kataoka Y, Mukohara T, Tomioka H, Funakoshi Y, Kiyota N, Fujiwara Y, Yashiro M, Hirakawa K, Hirai M, Minami H. Foretinib (GSK1363089), a multi-kinase inhibitor of MET and VEGFRs, inhibits growth of gastric cancer cell lines by blocking inter-receptor tyrosine kinase networks. *Invest New Drugs* 30 (4): 1352-1360, 2012 (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

Ekyalongo Roudy Chiminch, 向原 徹, 船越洋平, 富岡 秀夫, 片岡 優, 豊田 昌徳, 清田 尚臣, 南 博信. 乳癌における新規治療標的としての Tyro3. 第72回日本癌学会学術総会 横浜 2013年10月3-5日
谷岡真樹, 佐々木正興, 下村昭彦, 藤島茂, 土井美帆子, 松浦一生, 吉村健一, 内藤陽一, 高尾信太郎, 南博信. HER2陽性ホル

モン受容体陽性(HR+)乳癌における術前科学療法後病理学的完全寛解(pCR)の臨床的意義 第11回日本臨床腫瘍学会学術集会 仙台 2013年8月29-31日

船越洋平, 向原徹, 富岡秀夫, Ekyalongo Roudy Chiminch, 片岡優, 豊田昌徳, 清田尚美, 藤原豊, 南博信. Excessive MET signaling causes acquired resistance to and addiction to METinhibitors MET-amplified cancer cellline 第11回日本臨床腫瘍学会学術集会 仙台 2013年8月29-31日

Funakoshi Y, Mukohara T, Tomioka H, Ekyalongo RC, Kataoka Y, Inui Y, Kawamori Y, Kiyota N, Fujiwara Y, Minami H. Excessive MET signaling causes acquired resistance to and addiction to MET inhibitors in MKN45 gastric cancer cell line. 24th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics. November 6-9, 2012, Dublin, Ireland

Ekyalongo Roudy Chiminch, 向原 徹, 片岡 優, 船越 洋平, 富岡 秀夫, 清田 尚臣, 藤原 豊, 南 博信. MCF-7 乳癌細胞株における insuylin-like growth factor 1 receptor 受容体阻害薬に対する獲得耐性機構. 第71回日本癌学会学術総会 札幌 2012年9月19-21日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

南 博信(MINAMI, Hironobu)
神戸大学大学院医学研究科・教授
研究者番号:60450574

(2)研究分担者

向原 徹(MUKOUHARA, Toru)
神戸大学医学部附属病院・特命准教授
研究者番号: 80435718

(3) 研究分担者

吉田 優(YOSHIDA, Masaru)
神戸大学大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 00419475