

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-173334

(P2017-173334A)

(43) 公開日 平成29年9月28日(2017.9.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2GO45
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50	P
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/50	Z
	GO 1 N 33/15	Z

審査請求 有 請求項の数 14 O L (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2017-92161 (P2017-92161)	(71) 出願人	899000079 学校法人慶應義塾
(22) 出願日	平成29年5月8日 (2017.5.8)		東京都港区三田2丁目15番45号
(62) 分割の表示	特願2014-500945 (P2014-500945) の分割	(71) 出願人	000006884 株式会社ヤクルト本社
原出願日	平成25年2月22日 (2013.2.22)		東京都港区東新橋1丁目1番19号
(31) 優先権主張番号	特願2012-37448 (P2012-37448)	(74) 代理人	110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
(32) 優先日	平成24年2月23日 (2012.2.23)	(72) 発明者	谷川原 祐介 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大 学医学部内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	西牟田 章戸 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大 学医学部内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 併用抗がん剤の感受性判定マーカー

(57) 【要約】

【課題】個々の患者の治療反応性を判別できる抗がん剤感受性判定マーカー及びそれを利用する新たながん治療手段を提供する。

【解決手段】アミノ酸代謝系上の物質、核酸代謝系上の物質、ペントースリン酸経路上の物質、解糖系上の物質、TCA回路上の物質、ポリアミン代謝系上の物質並びに7,8-Dihydrobiopterin、6-Phosphogluconic acid、Butyric acid、Triethanolamine、1-Methylnicotinamide、NADH、NAD⁺及びそれら分子が関与する代謝系上の物質から選ばれる1以上の分子からなる、オキサリプラチン又はその塩とフルオロウラシル又はその塩を含む抗がん剤の感受性判定マーカー。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ酸代謝系上の物質、核酸代謝系上の物質、ペントースリン酸経路上の物質、解糖系上の物質、TCA回路上の物質、ポリアミン代謝系上の物質並びに 7, 8 - Dihydrobiopterin、6 - Phosphogluconic acid、Butyric acid、Triethanolamine、1 - Methylnicotinamide、NADH、NAD⁺ 及びそれら分子が関与する代謝系上の物質から選ばれる 1 以上の分子からなる、オキサリプラチン又はその塩とフルオロウラシル又はその塩を含む抗がん剤の感受性判定マーカー。

【請求項 2】

アミノ酸代謝系上の物質が、gamma - Glu - Cys、Gly、Arg、N - Acetyl - beta - alanine、N - Acetyloronithine、Cadaverine、Cysteic acid、2 - Amino adipic acid、GABA、beta - Ala - Lys、Glu - Glu、S - Lactoylglutathione、N, N - Dimethylglycine、3 - Methylhistidine、N⁵ - Ethylglutamine、glutathione 及び Cysteine - glutathione から選ばれる 1 以上の分子である請求項 1 記載の感受性判定マーカー。

【請求項 3】

核酸代謝系上の物質が、Guanosine、CMP、UMP、1 - Methyladenosine、UDP、CTP、dATP 及び Adenine から選ばれる 1 以上の分子である請求項 1 記載の感受性判定マーカー。

【請求項 4】

ペントースリン酸経路上の物質が、Sedoheptulose 7 - phosphate 及び / 又は PRPP である請求項 1 記載の感受性判定マーカー。

【請求項 5】

解糖系上の物質が、Dihydroxyacetone phosphate、2, 3 - diphosphoglyceric acid 及び Pyruvic acid から選ばれる 1 以上の分子である請求項 1 記載の感受性判定マーカー。

【請求項 6】

TCA回路上の物質が、Malic acid である請求項 1 記載の感受性判定マーカー。

【請求項 7】

ポリアミン代謝系上の物質が、N¹ - アセチルスペルミン、N - アセチルプトレシン、N⁸ - アセチルスペルミジン、プトレシン、スペルミン及びスペルミジンから選ばれる 1 以上の分子である請求項 1 記載の感受性判定マーカー。

【請求項 8】

オキサリプラチン又はその塩とフルオロウラシル又はその塩を含む抗がん剤の感受性を判定する目的で、検体中の請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の物質を測定する方法。

【請求項 9】

検体が、がんを有する被験者由来の生体試料である請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

検体が、オキサリプラチン又はその塩とフルオロウラシル又はその塩を含む抗がん剤を投与された、がんを有する被験者由来の生体試料である請求項 8 又は 9 記載の方法。

【請求項 11】

検体中の請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の物質を測定するためのプロトコールを含むことを特徴とする請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項記載の方法を実施するためのキット。

【請求項 12】

検体が、がんを有する被験者由来の生体試料である請求項 11 記載のキット。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

検体が、オキサリプラチン又はその塩とフルオロウラシル又はその塩を含む抗がん剤を投与された、がんを有する被験者由来の生体試料である請求項 1 1 又は 1 2 記載のキット。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の物質の発現変動を指標とするオキサリプラチン又はその塩とフルオロウラシル又はその塩を含む抗がん剤に対する感受性亢進剤のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、対象となる患者のがんが、抗がん剤に治療反応性を有するか否かを判定するために用いる抗がん剤感受性判定マーカー及びその応用に関する。

【背景技術】

【0002】

抗がん剤には、アルキル化剤、白金製剤、代謝拮抗剤、抗がん性抗生物質、抗がん性植物アルカロイド等の種類がある。そしてこれらの抗がん剤にはがんの種類によって効果を示す場合と効果を示さない場合がある。さらに、有効であると認められている種類のがんであっても、個々の患者によって効果を示す場合と効果を示さない場合があることが知られている。このような個々の患者のがんに対して抗がん剤が効果を示すか否かを抗がん剤感受性という。

【0003】

オキサリプラチン (L - OHP) は白金錯体系抗悪性腫瘍薬である。作用機序は他の白金錯体系抗悪性腫瘍薬であるシスプラチン (CDDP) やカルボプラチン (CBDCA) と同様、DNA塩基との架橋形成によるDNA合成阻害、蛋白合成阻害と考えられているが、CDDPやCBDCAが無効な大腸癌に対してもL - OHPは抗腫瘍効果を示し、従来の白金錯体系抗悪性腫瘍薬とは異なる抗腫瘍スペクトルを示す。アメリカでは2004年1月にフルオロウラシル (5 - FU) / レボホリナート (LV) との併用で転移性結腸・直腸癌のファーストライン治療薬として承認されており、日本においても2005年4月、「治療切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌」に対するLV及び5 - FUの静脈内持続投与方法との併用 (FOLFOX4法) にて薬価収載された。進行再発大腸癌の治療は、1990年代前半まで行なわれていた5 - FU / LV療法での生存率は10 ~ 12ヶ月であったのに対し、L - OHPを加えたFOLFOX療法での生存期間は19.5ヶ月とほぼ2倍にまで到達している。さらに2009年8月には、同じく5 - FU / LVの静脈内持続投与方法との併用による「結腸癌における術後補助化学療法」が効能・効果として追加され、大腸癌患者での使用拡大と有益性が期待できる薬剤である。

【0004】

5 - FUは、1957年に開発されたフッ化ピリミジン系抗癌剤であり、今なお消化器癌化学療法の基本となる薬剤である。がん細胞に取り込まれた5 - FUは、活性代謝物 fluorodeoxyuridine - 5' - monophosphate (FdUMP) による thymidylate synthase (TS) の阻害が惹起するDNA合成阻害を主たる作用機序とする他、同じく活性代謝物である 5 - fluorouridine triphosphate (FUTP) によるRNA機能障害などにより殺細胞効果を発揮する。

【0005】

進行性・転移大腸癌に対する化学療法は、1990年代に登場したイリノテカン (CPT - 11)、L - OHPなどのkey drugと、それまで大腸癌治療の中心的薬剤であった5 - FUを中心とするフッ化ピリミジン製剤とを併用することにより、生存率をはじめとする臨床成績が劇的に改善されたものの、治療が奏効する患者はおよそ半分程度であり、重篤な副作用というリスクを冒して抗がん剤が投与された患者の半分では効果が得られていないのが現状である。がん化学療法において最適な治療手段を提供するにあたり

10

20

30

40

50

、個々の治療反応性（レスポナー・ノンレスポナー）を判別する抗がん剤感受性の予測マーカーの確立は急務である。

【0006】

一般的に、がん化学療法の治療スケジュールは長期に渡り、副作用の発現を見ながら何クールか繰り返し治療を行った後で、効果が得られているか、そのまま投与を続けるべきか判断するが、それまでには長い時間と高額な医療費がかかり、副作用の発現も起こっているのが事実である。よって、個々の患者に対し、効果が得られるかどうかを治療前或いは治療早期に予測できる手段があれば、患者の負担や副作用の発現を軽減し、医療費を削減することができる。

【0007】

進行性大腸癌患者を対象とした化学療法に対する治療反応性バイオマーカーに関する大規模前向き臨床試験（FOCUS Trial）の報告では、5-FU/L-OHP併用療法の効果予測因子として、Topoisomerase-1（Topo1）のみが弱い関連を示したのみであった（非特許文献1）。従って、5-FU/L-OHP併用療法に感受性を持つ患者を確実に予測する手法は未だ確立されておらず、L-OHP/5-FU/LVの3剤併用によるFOLFOLX療法の効果予測もしくは治療応答性の早期診断を可能とするバイオマーカーの確立は急務である。また、近年では、FOLFOLX療法にペバシズマブを加えた療法も確立され、更に、セツキシマブやパニツムマブ等の抗体医薬及びイリノテカンやダサチニブ等の低分子化合物を加えた併用療法の臨床研究も進められており、これらの療法のkey drugとなる5-FUとL-OHPを含む抗がん剤の感受性判定マーカーの重要性は益々増大している。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】J Clin Oncol 2008; 26: 2690-2698.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の課題は、個々の患者の治療反応性を判別できる抗がん剤感受性判定マーカー及びそれを利用する新たながん治療手段を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

そこで本発明者らは、ヒトがん細胞株を培養し、5-FU/L-OHP曝露後の細胞内代謝変動についてキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計（CE-TOFMS）を用いて網羅的に解析し、抗がん剤感受性判定マーカーの探索を行ったところ、高感受性細胞で5-FU/L-OHP曝露後細胞内レベルの顕著な上昇が認められるピークを見出し、そのピークが、アミノ酸代謝系上の物質（Asp、Gly、Arg、N-Acetyl-beta-alanine、N-Acetylornithine、Cadaverine、Cysteic acid、2-Amino adipic acid、GABA（gamma-aminobutyric acid）、gamma-Glu-Cys、beta-Ala-Lys、Glu-Glu、S-Lactoylglutathione）、核酸代謝系上の物質（Guanosine、CMP、UMP、1-Methyladenosine、UDP、CTP）、ペントースリン酸経路上の物質（Sedoheptulose 7-phosphate）、解糖系上の物質（Dihydroxyacetone phosphate、2,3-diphosphoglyceric acid、Pyruvic acid）、TCA回路上の物質（Malic acid）、ポリアミン代謝系上の物質（N¹-アセチルスペルミン、N-アセチルプトレシン、N⁸-アセチルスペルミジン、プトレシン、スペルミン、スペルミジン）、7,8-Dihydrobiopterin、6-Phosphogluconic acidであることを見出した。また、低感受性細胞で5-FU/L-OHP曝露後細胞内レベルの顕著な上昇が認

10

20

30

40

50

められるピークを見出し、そのピークが、アミノ酸代謝系上の物質 (N, N - Dimethylglycine、3 - Methylhistidine、N⁵ - Ethylglutamine、glutathione)、核酸代謝系上の物質 (dATP)、Butyric acid、Triethanolamine、1 - Methyl nicotinamideであることを見出した。また、高感受性細胞で5 - FU/L - OHP曝露後細胞内レベルの顕著な低下が認められるピークを見出し、そのピークが、アミノ酸代謝系上の物質 (Cysteine - glutathione)、核酸代謝経路上の物質 (Adenine)、ペントースリン酸経路上の物質 (PRPP)であることを見出した。また、低感受性細胞で5 - FU/L - OHP曝露後細胞内レベルの顕著な低下が認められるピークを見出し、そのピークが、NADH、NAD⁺であることを見出した。また、GABAについては、薬剤処理前の細胞内レベルが高感受性細胞に比べ低感受性細胞で高いことを見出した。

10

さらに、大腸癌患者血液検体を対象とし、血中代謝物をCE - TOFMSを用いて網羅的に解析した結果、ペバシズマブ併用mFOLFOX6療法に対する治療反応性の低い患者で血中GABAレベルが高いことを見出した。

かかる知見に基づき、さらに検討した結果、がん患者由来の生体試料中のこれら代謝物の濃度を指標とすれば、当該がん患者のがんが抗がん剤に対する感受性を有するか否かを判定できること、また、これら代謝物の濃度や変動を指標とすれば抗がん剤感受性亢進剤のスクリーニングが可能になること、さらに当該抗がん剤感受性亢進剤と感受性亢進の対象となる抗がん剤を併用すれば、当該抗がん剤の治療効果が飛躍的に向上することを見出し、本発明を完成した。

20

【0011】

すなわち、本発明は、アミノ酸代謝系上の物質、核酸代謝系上の物質、ペントースリン酸経路上の物質、解糖系上の物質、TCA回路上の物質、ポリアミン代謝系上の物質並びに7, 8 - Dihydrobiopterin、6 - Phosphogluconic acid、Butyric acid、Triethanolamine、1 - Methyl nicotinamide、NADH、NAD⁺及びそれら分子が関与する代謝系上の物質から選ばれる1以上の分子からなる、オキサリプラチン又はその塩とフルオロウラシル又はその塩を含む抗がん剤の感受性判定マーカーを提供するものである。

また、本発明は、検体中の上記の物質を測定することを特徴とするオキサリプラチン又はその塩とフルオロウラシル又はその塩を含む抗がん剤の感受性判定方法を提供するものである。

30

また、本発明は、検体中の上記の物質を測定するためのプロトコールを含むことを特徴とするオキサリプラチン又はその塩とフルオロウラシル又はその塩を含む抗がん剤の感受性判定方法を実施するためのキットを提供するものである。

さらに本発明は、上記の物質の発現変動を指標とするオキサリプラチン又はその塩とフルオロウラシル又はその塩を含む抗がん剤に対する感受性亢進剤のスクリーニング方法を提供するものである。

さらにまた本発明は、上記のスクリーニング方法により得られたオキサリプラチン又はその塩とフルオロウラシル又はその塩を含む抗がん剤に対する感受性亢進剤を提供するものである。

40

さらに本発明は、上記の抗がん剤感受性亢進剤と、オキサリプラチン又はその塩とフルオロウラシル又はその塩を含む抗がん剤を含有するがん治療用組成物を提供するものである。

【発明の効果】

【0012】

本発明の抗がん剤感受性判定マーカーを用いれば、個々の患者の抗がん剤治療反応性が抗がん剤投与前、或いは抗がん剤投与開始後早期に適確に判定できる結果、より治療効果の高い抗がん剤の選択が可能となり、その結果として治療効果の期待できない抗がん剤の継続投与に伴うがんの進行、副作用の増大を防止でき、さらには患者の負担軽減、医療費

50

の削減も期待できる。また、このマーカーを用いれば、抗がん剤感受性を亢進させる薬剤がスクリーニングでき、その対象となった抗がん剤と抗がん剤感受性亢進剤とを併用すれば、がん治療効果が飛躍的に向上する。本発明の抗がん剤感受性判定マーカーの測定試薬は、抗がん剤感受性判定試薬として有用である。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】DL D - 1、HCT 116の5 - FU / L - OHP 24時間曝露後における各代謝系上の物質の変動を示す図である。

【図2】DL D - 1、HCT 116の薬剤処理前における細胞内GABAレベルを示す図である。

【図3】ペバシズマブ併用mFOLFOX6療法に対する治療反応性の異なる患者の血中GABAレベルを示す図である。SDは安定症例を、PRは部分奏効症例を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明における抗がん剤感受性判定マーカーの一つは、アミノ酸代謝系上の物質（アミノ酸代謝系物質ともいう）であり、当該物質としては代謝系においてアミノ酸代謝系物質の濃度を変動させるすべての物質が含まれ、アミノ酸代謝系物質への代謝を亢進する物質又は阻害する物質、アミノ酸代謝系物質からの代謝を促進する物質又は阻害する物質などが挙げられる。これらのうち、Asp、Gly、Arg、N - Acetyl - beta - alanine、N - Acetylornithine、Cadaverine、Cysteic acid、2 - Amino adipic acid、GABA (gamma - aminobutyric acid)、gamma - Glu - Cys、beta - Ala - Lys、Glu - Glu、S - Lactoylglutathione、N, N - Dimethylglycine、3 - Methylhistidine、N⁵ - Ethylglutamine、glutathione、Cysteine - glutathioneが好ましく、Cadaverine、gamma - Glu - Cys、beta - Ala - Lys、Glu - Glu、S - Lactoylglutathione、glutathione、GABAが特に好ましい。

【0015】

本発明における抗がん剤感受性判定マーカーの一つは、核酸代謝系上の物質（核酸代謝系物質ともいう）であり、当該物質としては核酸代謝系物質の濃度を変動させるすべての物質が含まれ、核酸代謝系物質への代謝を亢進する物質又は阻害する物質、核酸代謝系物質からの代謝を促進する物質又は阻害する物質などが挙げられる。これらのうち、Guanosine、CMP、UMP、1 - Methyladenosine、UDP、CTP、dATP、Adenineが好ましく、Guanosine、UMP、UDP、CTPが特に好ましい。

【0016】

本発明における抗がん剤感受性判定マーカーの一つは、ペントースリン酸経路上の物質（ペントースリン酸経路上物質ともいう）であり、当該物質としてはペントースリン酸経路上物質の濃度を変動させるすべての物質が含まれ、ペントースリン酸経路上物質への代謝を亢進する物質又は阻害する物質、ペントースリン酸経路上物質からの代謝を促進する物質又は阻害する物質などが挙げられる。これらのうち、Sedoheptulose 7 - phosphate、PRPPが特に好ましい。

【0017】

本発明における抗がん剤感受性判定マーカーの一つは、解糖系上の物質（解糖系物質ともいう）であり、当該物質としては解糖系物質の濃度を変動させるすべての物質が含まれ、解糖系物質への代謝を亢進する物質又は阻害する物質、解糖系物質からの代謝を促進する物質又は阻害する物質などが挙げられる。これらのうち、Dihydroxyacetone phosphate、2, 3 - diphosphoglyceric acid、Pyruvic acidが好ましく、Dihydroxyacetone phos

10

20

30

40

50

phate が特に好ましい。

【0018】

本発明における抗がん剤感受性判定マーカーの一つは、TCA回路上の物質（TCA回路上物質ともいう）であり、当該物質としてはTCA回路上物質の濃度を変動させるすべての物質が含まれ、TCA回路上物質への代謝を亢進する物質又は阻害する物質、TCA回路上物質からの代謝を促進する物質又は阻害する物質などが挙げられる。これらのうち、Malic acidが特に好ましい。

【0019】

本発明における抗がん剤感受性判定マーカーの一つは、ポリアミン代謝系上の物質（ポリアミン代謝系物質ともいう）であり、当該物質としては代謝系においてポリアミン代謝系物質の濃度を変動させるすべての物質が含まれ、ポリアミン代謝系物質への代謝を亢進する物質又は阻害する物質、ポリアミン代謝系物質からの代謝を促進する物質又は阻害する物質などが挙げられる。これらのうち、N¹-アセチルスペルミン、N-アセチルプトレシン、N⁸-アセチルスペルミジン、プトレシン、スペルミン、スペルミジンが特に好ましい。

10

【0020】

本発明における抗がん剤感受性判定マーカーの一つは、7,8-Dihydrobiopterin又はこれが関与する代謝系上の物質（7,8-Dihydrobiopterin代謝系物質ともいう）であり、当該物質としては7,8-Dihydrobiopterinの他、代謝系において7,8-Dihydrobiopterinの濃度を変動させるすべての物質が含まれ、7,8-Dihydrobiopterinへの代謝を亢進する物質又は阻害する物質、7,8-Dihydrobiopterinからの代謝を促進する物質又は阻害する物質などが挙げられる。これらのうち、7,8-Dihydrobiopterinが特に好ましい。

20

【0021】

本発明における抗がん剤感受性判定マーカーの一つは、6-Phosphogluconic acid又はこれが関与する代謝系上の物質（6-Phosphogluconic acid代謝系物質ともいう）であり、当該物質としては6-Phosphogluconic acidの他、代謝系において6-Phosphogluconic acidの濃度を変動させるすべての物質が含まれ、6-Phosphogluconic acidへの代謝を亢進する物質又は阻害する物質、6-Phosphogluconic acidからの代謝を促進する物質又は阻害する物質などが挙げられる。これらのうち、6-Phosphogluconic acidが特に好ましい。

30

【0022】

本発明における抗がん剤感受性判定マーカーの一つは、Butyric acid又はこれが関与する代謝系上の物質（Butyric acid代謝系物質ともいう）であり、当該物質としてはButyric acidの他、代謝系においてButyric acidの濃度を変動させるすべての物質が含まれ、Butyric acidへの代謝を亢進する物質又は阻害する物質、Butyric acidからの代謝を促進する物質又は阻害する物質などが挙げられる。これらのうち、Butyric acidが特に好ましい。

40

【0023】

本発明における抗がん剤感受性判定マーカーの一つは、Triethanolamine又はこれが関与する代謝系上の物質（Triethanolamine代謝系物質ともいう）であり、当該物質としてはTriethanolamineの他、代謝系においてTriethanolamineの濃度を変動させるすべての物質が含まれ、Triethanolamineへの代謝を亢進する物質又は阻害する物質、Triethanolamineからの代謝を促進する物質又は阻害する物質などが挙げられる。これらのうち、Triethanolamineが特に好ましい。

【0024】

50

本発明における抗がん剤感受性判定マーカーの一つは、1-Methylnicotinamide又はこれが関与する代謝系上の物質(1-Methylnicotinamide代謝系物質ともいう)であり、当該物質としては1-Methylnicotinamideの他、代謝系において1-Methylnicotinamideの濃度を変動させるすべての物質が含まれ、1-Methylnicotinamideへの代謝を亢進する物質又は阻害する物質、1-Methylnicotinamideからの代謝を促進する物質又は阻害する物質などが挙げられる。これらのうち、1-Methylnicotinamideが特に好ましい。

【0025】

本発明における抗がん剤感受性判定マーカーの一つは、NADH又はこれが関与する代謝系上の物質(NADH代謝系物質ともいう)であり、当該物質としてはNADHの他、代謝系においてNADHの濃度を変動させるすべての物質が含まれ、NADHへの代謝を亢進する物質又は阻害する物質、NADHからの代謝を促進する物質又は阻害する物質などが挙げられる。これらのうち、NADHが特に好ましい。

10

【0026】

本発明における抗がん剤感受性判定マーカーの一つは、NAD⁺又はこれが関与する代謝系上の物質(NAD⁺代謝系物質ともいう)であり、当該物質としてはNAD⁺の他、代謝系においてNAD⁺の濃度を変動させるすべての物質が含まれ、NAD⁺への代謝を亢進する物質又は阻害する物質、NAD⁺からの代謝を促進する物質又は阻害する物質などが挙げられる。これらのうち、NAD⁺が特に好ましい。

20

【0027】

上記の抗がん剤感受性判定マーカーのうち、Asp、N,N-ジメチルグリシン、gamma-Glu-Cys、glutathione、GABA、1-Methyladenosine、スペルミン、スペルミジン、7,8-Dihydrobiopterin、1-Methylnicotinamideは本発明者らによりイリノテカン、SN-38の感受性判定マーカーであることが確認されているが、新たに、5-FUとL-OHPを含む抗がん剤の感受性判定マーカーとなり得ることが見出された。

【0028】

Asp、Gly、Arg、N-Acetyl-beta-alanine、N-Acetylornithine、Cadaverine、Cysteic acid、2-Aminoadipic acid、gamma-Glu-Cys、beta-Ala-Lys、Glu-Glu、S-Lactoylglutathione、Guanosine、CMP、UMP、1-Methyladenosine、UDP、CTP、Sedoheptulose 7-phosphate、Dihydroxyacetone phosphate、2,3-diphosphoglyceric acid、Pyruvic acid、Malic acid、N¹-アセチルスペルミン、N-アセチルブトレシン、N⁸-アセチルスペルミジン、ブトレシン、スペルミン、スペルミジン、7,8-Dihydrobiopterin、6-Phosphogluconic acidは、後記実施例に示すように、5-FU/L-OHP曝露後、高感受性であるHCT116で細胞内レベルの顕著な上昇が認められた。一方、低感受性であるDLD-1ではHCT116ほどの細胞内レベルの顕著な変動は認められないが、若しくはコントロール群に比べて細胞内レベルが低下した。従って、これらの物質は、5-FUとL-OHPを含む抗がん剤の感受性判定マーカーとして有用である。

30

40

【0029】

N,N-Dimethylglycine、3-Methylhistidine、N⁵-Ethylglutamine、glutathione、dATP、Butyric acid、Triethanolamine、1-Methylnicotinamideは、後記実施例に示すように、5-FU/L-OHP曝露後、低感受性であるDLD-1で細胞内レベルの顕著な上昇が認められたが、高感受性であるHCT116ではDLD-1ほどの細胞内レベルの顕著な変動は認められないが、若しくはコントロール群に

50

比べて細胞内レベルが低下した。従って、これらの物質は、5-FUとL-OHPを含む抗がん剤の感受性判定マーカーとして有用である。

【0030】

Cysteine-glutathione、Adenine、PRPPは、後記実施例に示すように、5-FU/L-OHP曝露後、高感受性であるHCT116で細胞内レベルの顕著な低下が認められたが、低感受性であるDLD-1ではHCT116ほどの細胞内レベルの顕著な変動は認められないか、若しくはコントロール群に比べて細胞内レベルが上昇した。従って、これらの物質は、5-FUとL-OHPを含む抗がん剤の感受性判定マーカーとして有用である。

【0031】

NADH、NAD⁺は、後記実施例に示すように、5-FU/L-OHP曝露後、低感受性であるDLD-1で細胞内レベルの顕著な低下が認められたが、高感受性であるHCT116ではDLD-1ほどの細胞内レベルの顕著な変動は認められなかった。従って、これらの物質は、5-FUとL-OHPを含む抗がん剤の感受性判定マーカーとして有用である。

【0032】

GABAは、後記実施例に示すように、5-FU/L-OHP曝露後、高感受性であるHCT116で細胞内レベルの顕著な上昇が認められた。一方、低感受性であるDLD-1ではHCT116ほどの細胞内レベルの顕著な変動は認められなかった。また、薬剤処理前の細胞内レベルが高感受性であるHCT116に比べ低感受性であるDLD-1で高いことを見出した。さらに、ベパシズマブ併用mFOLFOX6療法に対する治療反応性の低い大腸癌患者の多くで血中レベルが高かった。従って、GABAは、5-FUとL-OHPを含む抗がん剤の感受性判定マーカーとして有用である。

【0033】

本発明の抗がん剤感受性判定マーカーの対象となる抗がん剤はオキサリプラチン又はその塩とフルオロウラシル又はその塩を含む抗がん剤であるが、体内で代謝されてオキサリプラチンやフルオロウラシルに変換される抗がん剤も、オキサリプラチンやフルオロウラシルと同様に本発明の抗がん剤感受性判定マーカーの対象となる。具体的に、テガフル(tegafur)やカペシタビン(capecitabine)は体内で代謝されてフルオロウラシルに変換されることが明らかになっているため、フルオロウラシルに代えてテガフルやカペシタビンも本発明の抗がん剤感受性判定マーカーの対象となり、その場合は、オキサリプラチン又はその塩とテガフル又はその塩を含む抗がん剤、オキサリプラチン又はその塩とカペシタビン又はその塩を含む抗がん剤が、本発明の抗がん剤感受性判定マーカーの対象となる。

【0034】

本発明の抗がん剤感受性判定マーカーの対象となる抗がん剤はオキサリプラチン又はその塩とフルオロウラシル又はその塩を含む抗がん剤であり、この抗がん剤と組み合わせて使用する他の抗がん剤としては特に限定されないが、例えばシクロフォスファミド(cyclophosphamide)、イフォスファミド(ifosfamide)、チオテパ(thiotepa)、メルファラン(melphalan)、ブスルファン(busulfan)、ニムスチン(nimustine)、ラニムスチン(ranimustine)、ダカルバジン(dacarbazine)、プロカルバジン(procabazine)、テモゾロミド(temozolomide)、シスプラチン(cisplatin)、カルボプラチン(carboplatin)、ネダプラチン(nedaplatin)、メトトレキサート(methotrexate)、ペメトレキセド(pemetrexed)、ウラシル(uracil)、ドキシフルリジン(doxifluridine)、ギメラシル/オテラシル(gimeracil・oteracil)、シタラビン(cytarabine)、エノシタビン(enocitabine)、ゲムシタビン(gemcitabine)、6-メルカプトプリン(6-mercaptopurine)、フルダラビン(fludarabine)、ペントスタチン(pentostatin)

10

20

30

40

50

tin)、クラドリピン (cladribine)、ヒドロキシウレア (hydroxyurea)、ドキシソルビシン (doxorubicin)、エピルビシン (epirubicin)、ダウノルビシン (daunorubicin)、イダルビシン (idarubicin)、ピラルビシン (pirarubicin)、ミトキサントロン (mitoxantrone)、アムルビシン (amurubicin)、アクチノマイシンD (actinomycin D)、ブレオマイシン (bleomycin)、ペブレオマイシン (pepleomycin)、マイトマイシンC (mytomycin C)、アクラルビシン (acliarubicin)、ジノスタチン (zinostatin)、ビンクリスチン (vincristine)、ビンデシン (vindesine)、ビンブラスチン (vinblastine)、ビノレルピン (vinorelbine)、パクリタキセル (paclitaxel)、ドセタキセル (docetaxel)、イリノテカン (irinotecan)、イリノテカン活性代謝物 (SN-38)、ノギテカン (nogitecan、topotecan)、エトポシド (etoposide)、プレドニゾロン (prednisolone)、デキサメタゾン (dexamethasone)、タモキシフェン (tamoxifen)、トレミフェン (toremifene)、メドロキシプロゲステロン (medroxyprogesterone)、アナストロゾール (anastrozole)、エキセメスタン (exemestane)、レトロゾール (letrozole)、リツキシマブ (rituximab)、イマチニブ (imatinib)、ゲフィチニブ (gefitinib)、ゲムツズマブ・オゾガマイシン (gemtuzumab ozogamicin)、ボルテゾミブ (bortezomib)、エルロチニブ (erlotinib)、セツキシマブ (cetuximab)、ベバシズマブ (bevacizumab)、スニチニブ (sunitinib)、ソラフェニブ (sorafenib)、ダサチニブ (dasatinib)、パニツムマブ (panitumumab)、アスパラギナーゼ (asparaginase)、トレチノイン (tretinoin)、三酸化ヒ素 (arsenic trioxide)、ホリナート (folinate)、レボホリナート (levofolinate)、又はそれらの塩、又はそれらの活性代謝物等が挙げられる。このうち、イリノテカン、SN-38、セツキシマブ、ベバシズマブ、ダサチニブ、パニツムマブ、ホリナート及びレボホリナートから選ばれる1以上の抗がん剤との組み合わせが好ましく、特にイリノテカン、セツキシマブ、ベバシズマブ、ホリナート及びレボホリナートから選ばれる1以上の抗がん剤との組み合わせが好ましく、オキサリプラチン又はその塩とフルオロウラシル又はその塩を含む抗がん剤との組み合わせの例としては、レボホリナート、ホリナート、レボホリナート及びベバシズマブ；ホリナート及びベバシズマブ；レボホリナート及びセツキシマブ；ホリナート及びセツキシマブ；又はイリノテカンが挙げられる。

【0035】

本発明の抗がん剤感受性判定マーカーを用いて抗がん剤感受性を判定するには、検体中のこれら代謝系物質を測定すればよい。ここで、検体としては、がんを有する被験者（がん患者）由来の生体試料、例えば血液、血清、血漿、尿、腫瘍組織・細胞、腹水、胸水、脳脊髄液、便、喀痰等が挙げられるが、血清が特に好ましい。

【0036】

また、本発明の対象となるがんとしては、咽頭がんを代表とする口唇、口腔及び咽頭がん、食道がん、胃がん、結腸・直腸がんなどを代表とする消化器がん、肺がんを代表とする呼吸器及び胸腔内臓器がん、骨及び関節軟骨がん、皮膚の悪性黒色腫、有棘細胞がん及びその他の皮膚のがん、中皮腫を代表とする中皮及び軟部組織がん、乳房がん、子宮がん、卵巣がんを代表とする女性性器がん、前立腺がんを代表とする男性性器がん、膀胱がんを代表とする尿路がん、脳腫瘍を代表とする眼、脳及び中枢神経系がん、甲状腺及びその他の内分泌腺がん、非ホジキンリンパ腫やリンパ性白血病を代表とするリンパ組織、造血組織及び関連組織がん、及びこれらを原発巣とする転移組織のがん等が挙げられるが、特に非小細胞肺がん、小細胞肺がん、子宮頸がん、卵巣がん、胃がん、結腸・直腸がん、有棘細胞がん、悪性リンパ腫に対して好適に利用できる。

【0037】

検体中のこれら代謝系物質の測定手段は、被測定対象物質により適宜決定すればよく、例えばCE-TOFMS、Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)等の各種質量分析装置、HPLC、免疫学的測定法、生化学的測定法等により測定可能である。

【0038】

Asp、Gly、Arg、N-Acetyl-beta-alanine、N-Acetylornithine、Cadaverine、Cysteic acid、2-Amino adipic acid、gamma-Glu-Cys、beta-Ala-Lys、Glu-Glu、S-Lactoylglutathione、Guanosine、CMP、UMP、1-Methyladenosine、UDP、CTP、Sedoheptulose 7-phosphate、Dihydroxyacetone phosphate、2,3-diphosphoglyceric acid、Pyruvic acid、Malic acid、N¹-アセチルスペルミン、N-アセチルブトレシン、N⁸-アセチルスペルミジン、ブトレシン、スペルミン、スペルミジン、7,8-Dihydrobiopterin、6-Phosphogluconic acidについて、対象とする抗がん剤に対する感受性を判定するには、抗がん剤投与前及び投与後のがん患者由来の生体試料中のこれら代謝系物質濃度を測定し、抗がん剤投与前に比べて投与後におけるこれら代謝系物質の濃度が上昇するか、あるいは所定の基準を上回ればそのがんは抗がん剤感受性であり、抗がん剤投与前後におけるこれら代謝系物質の濃度が変化しなかったり、あるいは所定の基準を下回ればそのがんは抗がん剤感受性ではないと判定できる。

対象とする抗がん剤に対して感受性を有さない場合は、その薬効を期待することができず、このような薬効の期待できない抗がん剤の投与が続けられた場合、がんの進行、副作用の増大が危惧される。このように、本発明における抗がん剤感受性判定マーカーは、抗がん剤治療反応性の判定のみならず、薬効の期待できない抗がん剤の継続投与に伴う副作用の増大を防ぐことにも大きく貢献する。

【0039】

N,N-Dimethylglycine、3-Methylhistidine、N⁵-Ethylglutamine、glutathione、dATP、Butyric acid、Triethanolamine、1-Methylnicotinamideについて、対象とする抗がん剤に対する感受性を判定するには、抗がん剤投与前及び投与後のがん患者由来の生体試料中のこれら代謝系物質濃度を測定し、抗がん剤投与前に比べて投与後におけるこれら代謝系物質の濃度が上昇するか、あるいは所定の基準を上回ればそのがんは抗がん剤感受性ではなく、抗がん剤投与前後におけるこれら代謝系物質の濃度が変化しなかったり、あるいは所定の基準を下回ればそのがんは抗がん剤感受性であると判定できる。

対象とする抗がん剤に対して感受性を有さない場合は、その薬効を期待することができず、このような薬効の期待できない抗がん剤の投与が続けられた場合、がんの進行、副作用の増大が危惧される。このように、本発明における抗がん剤感受性判定マーカーは、抗がん剤治療反応性の判定のみならず、薬効の期待できない抗がん剤の継続投与に伴う副作用の増大を防ぐことにも大きく貢献する。

【0040】

Cysteine-glutathione、Adenine、PRPPについて、対象とする抗がん剤に対する感受性を判定するには、抗がん剤投与前及び投与後のがん患者由来の生体試料中のこれら代謝系物質濃度を測定し、抗がん剤投与前に比べて投与後におけるこれら代謝系物質の濃度が低下するか、あるいは所定の基準を下回ればそのがんは抗がん剤感受性であり、抗がん剤投与前後におけるこれら代謝系物質の濃度が変化しなかったり、あるいは所定の基準を上回ればそのがんは抗がん剤感受性ではないと判定できる。

対象とする抗がん剤に対して感受性を有さない場合は、その薬効を期待することができ

10

20

30

40

50

ず、このような薬効の期待できない抗がん剤の投与が続けられた場合、がんの進行、副作用の増大が危惧される。このように、本発明における抗がん剤感受性判定マーカーは、抗がん剤治療反応性の判定のみならず、薬効の期待できない抗がん剤の継続投与に伴う副作用の増大を防ぐことにも大きく貢献する。

【0041】

NADH、NAD⁺について、対象とする抗がん剤に対する感受性を判定するには、抗がん剤投与前及び投与後のがん患者由来の生体試料中のこれら代謝系物質濃度を測定し、抗がん剤投与前に比べて投与後におけるこれら代謝系物質の濃度が低下するか、あるいは所定の基準を下回ればそのがんは抗がん剤感受性ではなく、抗がん剤投与前後におけるこれら代謝系物質の濃度が変化しなかったり、あるいは所定の基準を上回ればそのがんは抗がん剤感受性であると判定できる。

10

対象とする抗がん剤に対して感受性を有さない場合は、その薬効を期待することができず、このような薬効の期待できない抗がん剤の投与が続けられた場合、がんの進行、副作用の増大が危惧される。このように、本発明における抗がん剤感受性判定マーカーは、抗がん剤治療反応性の判定のみならず、薬効の期待できない抗がん剤の継続投与に伴う副作用の増大を防ぐことにも大きく貢献する。

【0042】

GABAについて、対象とする抗がん剤に対する感受性を判定するには、抗がん剤投与前及び投与後のがん患者由来の生体試料中のこれら代謝系物質濃度を測定し、抗がん剤投与前に比べて投与後におけるこれら代謝系物質の濃度が上昇するか、あるいは所定の基準を上回ればそのがんは抗がん剤感受性であり、抗がん剤投与前後におけるこれら代謝系物質の濃度が変化しなかったり、あるいは所定の基準を下回ればそのがんは抗がん剤感受性ではないと判定できる。また、抗がん剤投与前あるいは各治療サイクルにおける抗がん剤投与前の段階において、これら代謝系物質の濃度が所定の標準濃度より高いと判断される濃度を有する場合は、そのがんは対象とする抗がん剤に対して感受性がないと判定できる。

20

対象とする抗がん剤に対して感受性を有さない場合は、その薬効を期待することができず、このような薬効の期待できない抗がん剤の投与が続けられた場合、がんの進行、副作用の増大が危惧される。このように、本発明における抗がん剤感受性判定マーカーは、抗がん剤治療反応性の判定のみならず、薬効の期待できない抗がん剤の継続投与に伴う副作用の増大を防ぐことにも大きく貢献する。

30

【0043】

本発明の抗がん剤感受性の判定方法を実施するには、検体中のこれら代謝系物質を測定するためのプロトコールを含むキットを用いるのが好ましい。当該キットには、これら代謝系物質測定試薬、測定試薬の使用法、及び抗がん剤感受性の有無を判定するための基準等が含まれる。当該基準には、これら代謝系物質の標準濃度や標準比、高いと判断される濃度や比、低いと判断される濃度や比、測定結果に影響を与える要因とその影響の程度等が含まれ、これらの濃度は対象とする抗がん剤ごとに設定することが可能である。当該基準を用いて、前記のように判定することができる。

【0044】

抗がん剤曝露後における Asp、Gly、Arg、N - Acetyl - beta - alanine、N - Acetylornithine、Cadaverine、Cystic acid、2 - Amino adipic acid、gamma - Glu - Cys、beta - Ala - Lys、Glu - Glu、S - Lactoylglutathione、Guanosine、CMP、UMP、1 - Methyladenosine、UDP、CTP、Sedoheptulose 7 - phosphate、Dihydroxyacetone phosphate、2,3 - diphosphoglyceric acid、Pyruvic acid、Malic acid、N¹ - アセチルスペルミン、N - アセチルプトレシン、N⁸ - アセチルスペルミジン、プトレシン、スペルミン、スペルミジン、7,8 - Dihydrobiopterin、6 - Phosphog

40

50

luconic acidの発現変動、具体的には変動の促進或いは濃度の上昇を指標とすれば、抗がん剤感受性亢進剤がスクリーニングできる。すなわち、in vitro又はin vivoにおいてAsp、Gly、Arg、N - Acetyl - beta - alanine、N - Acetylornithine、Cadaverine、Cysteic acid、2 - Amino adipic acid、gamma - Glu - Cys、beta - Ala - Lys、Glu - Glu、S - Lactoylglutathione、Guanosine、CMP、UMP、1 - Methyladenosine、UDP、CTP、Sedoheptulose 7 - phosphate、Dihydroxyacetone phosphate、2, 3 - diphosphoglyceric acid、Pyruvic acid、Malic acid、N¹ - アセチルスペルミン、N - アセチルプトレシン、N⁸ - アセチルスペルミジン、プトレシン、スペルミン、スペルミジン、7, 8 - Dihydrobiopterin、6 - Phosphogluconic acidの抗がん剤曝露後における変動を促進或いは濃度を上昇させる物質は、抗がん剤感受性を亢進する。例えば、in vitroにおいて、抗がん剤曝露後の細胞内におけるAsp、Gly、Arg、N - Acetyl - beta - alanine、N - Acetylornithine、Cadaverine、Cysteic acid、2 - Amino adipic acid、gamma - Glu - Cys、beta - Ala - Lys、Glu - Glu、S - Lactoylglutathione、Guanosine、CMP、UMP、1 - Methyladenosine、UDP、CTP、Sedoheptulose 7 - phosphate、Dihydroxyacetone phosphate、2, 3 - diphosphoglyceric acid、Pyruvic acid、Malic acid、N¹ - アセチルスペルミン、N - アセチルプトレシン、N⁸ - アセチルスペルミジン、プトレシン、スペルミン、スペルミジン、7, 8 - Dihydrobiopterin、6 - Phosphogluconic acidの変動を促進或いは濃度を上昇させる物質は、当該抗がん剤の感受性を亢進する物質（抗がん剤感受性亢進剤）である。また、in vivoにおいては、担癌動物における抗がん剤曝露後のAsp、Gly、Arg、N - Acetyl - beta - alanine、N - Acetylornithine、Cadaverine、Cysteic acid、2 - Amino adipic acid、gamma - Glu - Cys、beta - Ala - Lys、Glu - Glu、S - Lactoylglutathione、Guanosine、CMP、UMP、1 - Methyladenosine、UDP、CTP、Sedoheptulose 7 - phosphate、Dihydroxyacetone phosphate、2, 3 - diphosphoglyceric acid、Pyruvic acid、Malic acid、N¹ - アセチルスペルミン、N - アセチルプトレシン、N⁸ - アセチルスペルミジン、プトレシン、スペルミン、スペルミジン、7, 8 - Dihydrobiopterin、6 - Phosphogluconic acidの変動を促進或いは濃度を上昇させる物質は、当該抗がん剤の感受性を亢進する物質（抗がん剤感受性亢進剤）である。

【0045】

また、抗がん剤曝露後におけるN, N - Dimethylglycine、3 - Methylhistidine、N⁵ - Ethylglutamine、glutathione、dATP、Butyric acid、Triethanolamine、1 - Methylnicotinamideの発現変動の有無を指標とすれば、抗がん剤感受性亢進剤がスクリーニングできる。すなわち、in vitro又はin vivoにおいてN, N - Dimethylglycine、3 - Methylhistidine、N⁵ - Ethylglutamine、glutathione、dATP、Butyric acid、Triethanolamine、1 - Methylnicotinamideの抗がん剤曝露後における変動を小さくする物質は、抗がん剤感受性を亢進する。例えば、in vitroにおいて、抗がん剤曝露後の細胞内におけるN, N - Dimethylglycine、3 - Methylhistidine、N⁵ - Ethylgl

utamine、glutathione、dATP、Butyric acid、Triethanolamine、1-Methylnicotinamideの変動を小さくする物質は、当該抗がん剤の感受性を亢進する物質（抗がん剤感受性亢進剤）である。また、*in vivo*においては、担癌動物における抗がん剤曝露後のN,N-Dimethylglycine、3-Methylhistidine、N⁵-Ethylglutamine、glutathione、dATP、Butyric acid、Triethanolamine、1-Methylnicotinamideの変動を小さくする物質は、当該抗がん剤の感受性を亢進する物質（抗がん剤感受性亢進剤）である。

【0046】

また、抗がん剤曝露後におけるCysteine-glutathione、Adenine、PRPPの発現変動、具体的には変動の促進或いは濃度の低下を指標とすれば、抗がん剤感受性亢進剤がスクリーニングできる。すなわち、*in vitro*又は*in vivo*においてCysteine-glutathione、Adenine、PRPPの抗がん剤曝露後における変動を促進或いは濃度を低下させる物質は、抗がん剤感受性を亢進する。例えば、*in vitro*において、抗がん剤曝露後の細胞内におけるCysteine-glutathione、Adenine、PRPPの変動を促進或いは濃度を低下させる物質は、当該抗がん剤の感受性を亢進する物質（抗がん剤感受性亢進剤）である。また、*in vivo*においては、担癌動物における抗がん剤曝露後のCysteine-glutathione、Adenine、PRPPの変動を促進或いは濃度を低下させる物質は、当該抗がん剤の感受性を亢進する物質（抗がん剤感受性亢進剤）である。

10

20

【0047】

また、抗がん剤曝露後におけるNADH、NAD⁺の発現変動の有無を指標とすれば、抗がん剤感受性亢進剤がスクリーニングできる。すなわち、*in vitro*又は*in vivo*においてNADH、NAD⁺の抗がん剤曝露後における変動を小さくする物質は、抗がん剤感受性を亢進する。例えば、*in vitro*において、抗がん剤曝露後の細胞内におけるNADH、NAD⁺の変動を小さくする物質は、当該抗がん剤の感受性を亢進する物質（抗がん剤感受性亢進剤）である。また、*in vivo*においては、担癌動物における抗がん剤曝露後のNADH、NAD⁺の変動を小さくする物質は、当該抗がん剤の感受性を亢進する物質（抗がん剤感受性亢進剤）である。

30

【0048】

抗がん剤曝露後におけるGABAの発現変動を指標とすれば、抗がん剤感受性亢進剤がスクリーニングできる。すなわち、*in vitro*又は*in vivo*においてGABAの抗がん剤曝露前における濃度を低下させる物質、抗がん剤曝露後における変動を促進或いは濃度を上昇させる物質は、抗がん剤感受性を亢進する。例えば、*in vitro*において、抗がん剤曝露前に各種がん細胞株をある物質で処理した時、細胞内におけるGABAの濃度を低下させる物質は、当該抗がん剤の感受性を亢進する物質（抗がん剤感受性亢進剤）である。また、*in vitro*において、各種がん細胞株における抗がん剤曝露後の細胞内におけるGABAの変動を促進或いは濃度を上昇させる物質は、当該抗がん剤の感受性を亢進する物質（抗がん剤感受性亢進剤）である。また、*in vivo*においては、担癌動物における抗がん剤曝露前のGABAの濃度を低下させる物質、抗がん剤曝露後のGABAの変動を促進或いは濃度を上昇させる物質は、当該抗がん剤の感受性を亢進する物質（抗がん剤感受性亢進剤）である。

40

【0049】

さらに、本発明の抗がん剤感受性判定マーカーを指標とすれば、抗がん剤がスクリーニングできる。すなわち、*in vitro*又は*in vivo*において、ある物質により抗がん剤感受性判定マーカーの濃度が変動すれば、その物質は抗がん剤である。例えば、*in vitro*では、ある物質を各種がん細胞株に曝露後、曝露前に比べて抗がん剤感受性判定マーカーの濃度が変動すれば、その物質は抗がん剤である。また、担癌動物にある物質を投与した後、抗がん剤感受性判定マーカーの濃度が変動すれば、その物質は抗がん剤

50

ん剤である。薬効が期待できる抗がん剤であれば、抗がん剤感受性判定マーカーの濃度変動は腫瘍の縮小あるいは殺細胞効果よりも早く現れるため、抗がん剤感受性判定マーカーを指標としたスクリーニングにより、より短時間の検討で当該物質が抗がん剤として有用であるかどうかを判定することができる。抗がん剤開発に伴う労力や費用の削減という面からも大きな効果が期待できる。

【0050】

かくして得られた抗がん剤感受性亢進剤と感受性亢進の対象となる抗がん剤とを併用すれば、当該抗がん剤の治療効果が飛躍的に向上する。抗がん剤感受性亢進剤と感受性亢進の対象となる抗がん剤とを組み合わせた形態としては、それらの成分の両方を含む一の組成物であってもよく、それぞれ別個の製剤の組み合わせであってもよい。また、それらの成分はそれぞれ別の投与経路であってもよい。ここで用いられる対象となる抗がん剤はオキサリプラチン又はその塩とフルオロウラシル又はその塩を含む抗がん剤であり、この抗がん剤と組み合わせて使用する他の抗がん剤としては特に限定されないが、例えばシクロフォスファミド(cyclophosphamide)、イフォスファミド(ifosfamide)、チオテパ(thiotepa)、メルファラン(melphalan)、ブスルファン(busulfan)、ニムスチン(nimustine)、ラニムスチン(ranimustine)、ダカルバジン(dacarbazine)、プロカルバジン(procabazine)、テモゾロミド(temozolomide)、シスプラチン(cisplatin)、カルボプラチン(carboplatin)、ネダプラチン(nedaplatin)、メトトレキサート(methotrexate)、ペメトレキセド(pemetrexed)、ウラシル(uracil)、ドキシフルリジン(doxifluridine)、ギメラシル/オテラシル(gimeracil・otera cil)、シタラビン(cytarabine)、エノシタピン(enocitabine)、ゲムシタピン(gemcitabine)、6-メルカプトプリン(6-mercaptopurine)、フルダラビン(fuludarabine)、ペントスタチン(pentostatin)、クラドリビン(cladribine)、ヒドロキシウレア(hydroxyurea)、ドキシルビシン(doxorubicin)、エピルビシン(epirubicin)、ダウノルビシン(daunorubicin)、イダルビシン(idarubicin)、ピラルビシン(pirarubicin)、ミトキサントロン(mitoxantrone)、アムルビシン(amurubicin)、アクチノマイシンD(actinomycin D)、ブレオマイシン(bleomycin)、ペブレオマイシン(pepleomycin)、マイトマイシンC(mytomycin C)、アクラルビシン(aclarubicin)、ジノスタチン(zinostatin)、ビンクリスチン(vincristine)、ビンデシン(vindesine)、ビンブラスチン(vinblastine)、ビノレルビン(vinorelbine)、パクリタキセル(paclitaxel)、ドセタキセル(docetaxel)、イリノテカン(irinotecan)、イリノテカン活性代謝物(SN-38)、ノギテカン(nogitecan、topotecan)、エトポシド(etoposide)、プレドニゾロン(prednisolone)、デキサメタゾン(dexamethasone)、タモキシフェン(tamoxifen)、トレミフェン(toremifene)、メドロキシプロゲステロン(medroxyprogesterone)、アナストロゾール(anastrozole)、エキセメスタン(exemestane)、レトロゾール(letrozole)、リツキシマブ(rituximab)、イマチニブ(imatinib)、ゲフィチニブ(gefitinib)、ゲムツズマブ・オゾガマイシン(gemtuzumab ozogamicin)、ボルテゾミブ(bortezomib)、エルロチニブ(erlotinib)、セツキシマブ(cetuximab)、ベバシズマブ(bevacizumab)、スニチニブ(sunitinib)、ソラフェニブ(sorafenib)、ダサチニブ(dasatinib)、パニツムマブ(panitumumab)、アスパラギナーゼ(asparaginase)、トレチノイン(tretinoin)、三酸化ヒ素(arsenic triox

ide)、ホリナート(folinat e)、レボホリナート(levofolinat e)、又はそれらの塩、又はそれらの活性代謝物等が挙げられる。このうち、イリノテカン、SN-38、セツキシマブ、ベバシズマブ、ダサチニブ、パニツムマブ、ホリナート及びレボホリナートから選ばれる1以上の抗がん剤との組み合わせが好ましく、特にイリノテカン、セツキシマブ、ベバシズマブ、ホリナート及びレボホリナートから選ばれる1以上の抗がん剤との組み合わせが好ましく、オキサリプラチン又はその塩とフルオロウラシル又はその塩を含む抗がん剤との組み合わせの例としては、レボホリナート、ホリナート、レボホリナート及びベバシズマブ；ホリナート及びベバシズマブ；レボホリナート及びセツキシマブ；ホリナート及びセツキシマブ；又はイリノテカンが挙げられる。

【実施例】

【0051】

以下、実施例を挙げて本発明の内容をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらにより何ら制約されるものではない。

【0052】

実施例1

(1)方法

(a)使用細胞

2種類のヒト大腸癌細胞株(高感受性:HCT116、低感受性:DLD-1)を用いた。HCT116は株式会社ヤクルト本社より、DLD-1は大日本住友製薬株式会社より入手した。これらの細胞は、10% Fetal Bovine Serum (インビトロジェン社)を含むDoubecco's modified Eagle's Medium (DMEM)を用いて、100mm/Tissue Culture Dish (IWAKI)にて37、5%CO₂の条件下で培養した。

(b)薬剤

L-OHP原末は、株式会社ヤクルト本社より入手した。また、5-FU原末は、シグマアルドリッチジャパン株式会社より入手した。

【0053】

(c)5-FU/L-OHP曝露と細胞内代謝物の採取

両細胞に対して、100µmol/Lの5-FU及び10µmol/LのL-OHPを含む培地に交換することにより抗がん剤曝露を開始した(抗がん剤を含まない培地を用いたものをコントロール群とした)。0hr、4hr、12hr、24hr、48hr曝露後に氷上にて5%マンニトール(4)で細胞を洗浄後、素早くメタノール(4、内部標準物質含有)を添加することにより酵素を失活させ、-80で保存した。なお、細胞数算出用の細胞を代謝物抽出用の細胞とは別に準備し、同様の処理を行った後セルカウントを行い、細胞数補正に用いた。

【0054】

(d)メタボロームサンプルの調製

-80保存メタノール溶液に、クロロホルムとミリQ水を加え液液抽出を行い、夾雑成分を除去した。代謝物を含む水メタノール層を採取し、分画分子量5000Daの遠心限外ろ過フィルターを用いて除タンパクを行った後、ろ液を減圧乾燥し、-80にて保存した。測定直前にミリQ水に溶解させ、メタボローム測定に供した。

【0055】

(e)メタボローム測定

細胞内代謝物の網羅的測定はAgilent Technologies社のキャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析計(CE-TOFMS)にて行った。陽イオン性代謝物の網羅的測定ではキャピラリーの出口が陰極となるように電圧を印加し、また、陰イオン性代謝物の網羅的測定ではキャピラリーの出口が陽極となるように電圧を印加し、m/z=50~1000の代謝物を一斉に定量分析した。

【0056】

(f)データ解析

10

20

30

40

50

各細胞サンプルからCE-TOFMSにより検出されたピークは、既にm/z及び移動時間が明らかとなっている約500の標品データとの照合により同定した。代謝物量はピーク面積を内部標準物質のピーク面積で除し、標本による差を補正した。

【0057】

(2) 結果

感受性の異なる2種類のヒト大腸癌細胞（高感受性：HCT-116、低感受性：DL-D-1）について、5-FU/L-OHP 24時間曝露後の細胞内メタボロームデータに着目し、5-FU/L-OHP曝露後に変動が認められた代謝物をピックアップした（図1）。その結果、高感受性細胞で5-FU/L-OHP曝露後細胞内レベルの顕著な上昇が認められる代謝物として、Asp、Gly、Arg、N-Acetyl-beta-alanine、N-Acetylornithine、Cadaverine、Cysteic acid、2-Amino adipic acid、GABA (gamma-aminobutyric acid)、gamma-Glu-Cys、beta-Ala-Lys、Glu-Glu、S-Lactoylglutathione、Guanosine、CMP、UMP、1-Methyladenosine、UDP、CTP、Sedoheptulose 7-phosphate、Dihydroxyacetone phosphate、2,3-diphosphoglyceric acid、Pyruvic acid、Malic acid、N¹-アセチルスペルミン、N-アセチルブトレシン、N⁸-アセチルスペルミジン、ブトレシン、スペルミン、スペルミジン、7,8-Dihydrobiopterin、6-Phosphogluconic acidを見出した。また、低感受性細胞で5-FU/L-OHP曝露後細胞内レベルの顕著な上昇が認められる代謝物として、N,N-Dimethylglycine、3-Methylhistidine、N⁵-Ethylglutamine、glutathione、dATP、Butyric acid、Triethanolamine、1-Methylnicotinamideを見出した。また、高感受性細胞で5-FU/L-OHP曝露後細胞内レベルの顕著な低下が認められる代謝物として、Cysteine-glutathione、Adenine、PRPPを見出した。また、低感受性細胞で5-FU/L-OHP曝露後細胞内レベルの顕著な低下が認められる代謝物として、NADH、NAD⁺を見出した。

【0058】

また、GABAについては、薬剤処理前の細胞内レベルが高感受性細胞に比べ低感受性細胞で高いことを見出した（図2）。

【0059】

実施例2

ベパシズマブ併用mFOLFOLX6療法によるヒト臨床試験による検討

1. 方法

フルオロウラシル400mg/平方メートル（急速静注）、レボホリナート200mg/平方メートル、フルオロウラシル2,400mg/平方メートル（持続点滴静注）にオキサリプラチン85mg/平方メートル、ベパシズマブ5mg/kgを併用投与するがん化学療法（ベパシズマブ併用mFOLFOLX6療法）を実施したがん患者において、がん化学療法の有効性及び安全性を検討するとともに、それらの個体差要因についても探索的検討を実施する第2相臨床試験を行った。対象は切除不能な進行・再発症例であり、且つ化学療法、免疫療法又は放射線療法による前治療のない症例とした。具体的な選択基準は、（1）病理組織学的に結腸癌あるいは直腸癌であることが確認されている症例、（2）治癒切除不能な進行・再発症例、（3）測定可能病変を有する症例、（4）化学療法、免疫療法または放射線療法による前治療のない症例（フルオロウラシル系薬剤による術後補助化学療法に限り、再発確認日から6ヶ月前に終了していれば登録可能とする）、（5）登録時の年齢が20歳以上の症例、（6）Performance status（ECOG scale）が0または1の症例、（7）3ヶ月以上の生存が期待できる症例、（8）主要臓器機能（骨髄、肝、腎、心、肺など）に高度な障害が無く、かつ登録前14日

以内（登録日を含めず）に実施した臨床検査値が以下の基準を満たす症例。白血球数 $4,000$ / 立方ミリメートル以上 $12,000$ / 立方ミリメートル以下、好中球数 $2,000$ / 立方ミリメートル以上、ヘモグロビン量 9.0 g / dL 以上、血小板数 $100,000$ / 立方ミリメートル以上、AST 100 IU / L 以下、ALT 100 IU / L 以下、総ビリルビン 1.5 mg / dL 以下、血清クレアチニン 1.5 mg / dL 以下、尿蛋白 $1+$ 以下（定性）、プロトロンビン時間国際標準比表示 1.5 以下。（9）本試験登録前に、遺伝子多型検査やプロテオーム・メタボローム分析を含む試験の参加について、患者本人による署名、日付が記載された同意書が得られている症例、とし、除外基準を、（1）登録前 14 日以内に輸血、血液製剤および G - C S F 等の造血因子製剤の投与を行った症例、（2）重篤な薬剤過敏症の既往を有する症例、（3）同時性および無病期間が 5 年未満の異時性重複癌を有する症例、（4）感覚異常または知覚不全のある症例、（5）臨床上問題となる感染症を有する症例、（6）HBs 抗原陽性の症例、（7）登録前 28 日以内の心電図等で、臨床上問題となる心疾患を有する症例、（8）胸部単純 X 線像等にて明らかな間質性肺炎、肺線維症を有する症例、（9）治療を必要とする胸水、腹水または心嚢水を有する症例、（10）下痢（水様便を含む）を呈する症例、（11）脳転移を有することが明らかな症例、または臨床的な症状から脳転移が疑われる症例、（12）血栓塞栓症の既往を有する症例、（13）登録前 28 日以内に開腹術または腸管切除術、登録前 14 日以内にストーマの造設、切開を伴う生検、または外傷に対する縫合処置を行った症例、（14）血小板機能を抑制する薬剤（アスピリン製剤あるいは非ステロイド抗炎症薬を投与中の症例、（15）コントロール不良な消化管潰瘍を有する症例、（16）過去 12 ヶ月以内に消化管穿孔の既往を有する症例、（17）コントロール不良な高血圧を有する症例、（18）コントロール不良な糖尿病を有する症例、（19）強心配糖体を投与中の症例、（20）精神病または精神症状を合併しており試験への参加が困難と判断される症例、（21）妊娠中または授乳中の女性、授乳を希望する男女、避妊する意思のない男女、（22）担当医師が本試験の有効性・安全性を評価するのに不相当と判断した症例、とした。試験治療として各サイクル第 1 日目にベバシズマブ、オキサリプラチン、フルオロウラシル（急速静注）、レボホリナート、第 1 日目から第 3 日目にかけてフルオロウラシル（持続点滴静注）の投与を行った。1 サイクルを 2 週間（ 14 日間）とし、中止基準に該当しない限り最大 24 サイクルまで投与を行った。

10

20

30

【0060】

計 70 例が臨床試験に参加し、このうち 68 例で標的病変における腫瘍縮小効果の評価が可能であった。 68 例中、全例で薬剤反応性バイオマーカーを探索するために要する検体が得られた。このうち、試験治療が早期に終了した 13 例について、各サイクルにおける薬剤投与開始前の患者血清中に含まれるメタボロームを CE - T O F M S にて一斉解析した。メタボローム抽出法、メタボローム測定、データ解析については、実施例 1 に準じた。なお、患者の治療感受性については、最良総合効果（治療開始から増悪 / 再発までに記録された最良の効果）に基づき判定した。

【0061】

2. 結果

患者の治療感受性を最良総合効果に基づいて判定した結果、 13 例中、安定（SD）症例は 6 例、部分奏効（PR）症例は 7 例であった。各サイクルにおける薬剤投与開始前の患者血清中に含まれるメタボロームを CE - T O F M S にて一斉解析した結果、部分奏効（PR）症例の血中 G A B A レベルは全症例で低く、安定（SD）症例 6 例中 4 例で血中 G A B A レベルが高いことが明らかとなった（図 3）。

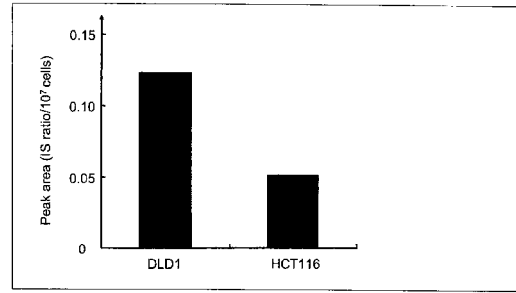
40

【 図 1 】

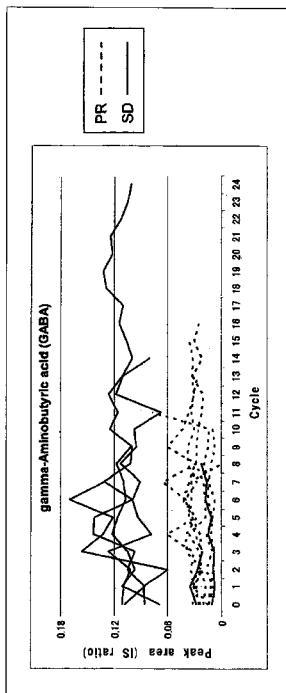
Metabolite	DLD1	HCT116	Ratio (HCT116/DLD-1)
Asp	2.54	4.96	1.95
GW	1.20	1.94	1.62
Arg	1.41	2.34	1.66
N-Acetyl-beta-alanine	1.38	2.26	1.66
N-Acetylmethionine	1.21	2.00	1.65
N-(1-Dimethyl)glycine	2.05	1.28	0.61
3-Methylhistidine	1.63	1.07	0.65
N-Ethylglutamine	1.63	1.06	0.65
gamma-Glu-Cys	0	8.23	∞
beta-Ala-Lys	1.98	4.28	3.15
Glutathione (GSH)	24.80	3.80	0.15
Glu-Glu	1.19	3.32	2.79
S-Acetylglutathione	0.95	2.27	2.39
Cysteine-glutathione	0.38	0.20	0.55
Cadaverine	0	3.85	∞
Cystic acid	2.15	3.42	1.59
2-Aminoadipic acid	1.90	2.00	1.54
gamma-Aminobutyric acid	1.02	1.79	1.76
Guanosine	1.00	3.47	3.48
GMP	1.85	3.09	1.68
UMP	1.37	2.93	2.14
1-Methyladenosine	1.78	2.88	1.62
UDP	0.96	2.38	2.43
CTP	1.01	2.07	2.04
GATP	2.39	1.25	0.52
Adenine	1.15	0.83	0.55
Sedoheptulose 7-phosphate	1.68	3.61	2.14
PRPP	0.93	0.26	0.28
Dihydroxyacetone phosphate	0.90	2.41	2.68
2,3-Diphosphoglyceric acid	0.82	1.54	1.86
Pyruvic acid	1.52	2.84	1.74
Malic acid	1.51	2.65	1.75
N-Acetylsermine	1.97	6.52	3.26
N-Acetylputrescine	0	3.52	∞
N-Acetylspemidine	0.82	3.26	3.97
Putrescine	0.74	3.26	4.40
Spermine	0.85	2.31	2.72
Spermidine	0.64	1.84	3.39
7,8-Dihydrobiopterin	1.45	2.42	1.68
6-Phosphogluconic acid	0.82	1.81	1.95
Butyric acid	2.69	1.93	0.57
Trehalolamine	2.02	1.27	0.63
1-Methylnicotinamide	1.98	1.04	0.53
NADH	0.44	0.70	1.57
NAD ⁺	0.30	0.64	2.12

それぞれの細胞における、24時間5-FU/L-OHP曝露後の細胞内レベル/コントロール群の細胞内レベルの比率

【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

(72)発明者 津 崎 盾哉

東京都新宿区信濃町3 5 番地 慶應義塾大学医学部内

(72)発明者 高 橋 寛行

東京都港区東新橋1 丁目1 番1 9 号 株式会社ヤクルト本社内

Fターム(参考) 2G045 AA26 DA03 DA15 DA35 DA36