

(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2019-194597

(P2019-194597A)

(43) 公開日 令和1年11月7日(2019.11.7)

(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 Z N A	2 G O 4 5
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	4 B O 6 3
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	4 C O 8 4
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	4 C 2 O 6
A 6 1 K 31/282 (2006.01)	A 6 1 K 31/282	

審査請求 有 請求項の数 22 O L (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-103562 (P2019-103562)	(71) 出願人	899000079
(22) 出願日	令和1年6月3日 (2019.6.3)		学校法人慶應義塾
(62) 分割の表示	特願2016-545546 (P2016-545546) の分割		東京都港区三田2丁目15番45号
原出願日	平成27年8月25日 (2015.8.25)	(71) 出願人	000006884
(31) 優先権主張番号	特願2014-171729 (P2014-171729)		株式会社ヤクルト本社
(32) 優先日	平成26年8月26日 (2014.8.26)		東京都港区東新橋1丁目1番19号
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)	(74) 代理人	110000084
(特許庁注：以下のものは登録商標)			特許業務法人アルガ特許事務所
1. T W E E N		(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
		(72) 発明者	原 可奈子
			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】 抗がん剤の感受性の判定マーカー

(57) 【要約】

【課題】 新たな抗がん剤感受性判定マーカーの提供。

【解決手段】 PHB、ANXA5、ANXA1、TALDO、C1QBP、IPYR、CRBP1及びCOX5Aから選ばれる1以上の分子からなる抗がん剤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】
T A L D O からなる抗がん剤感受性判定マーカー。
- 【請求項 2】
抗がん剤が、白金錯体系抗がん剤である請求項 1 記載の抗がん剤感受性判定マーカー。
- 【請求項 3】
抗がん剤が、オキサリプラチン又はその塩から選ばれるものである請求項 1 又は 2 記載の抗がん剤感受性判定マーカー。
- 【請求項 4】
さらに、C 1 Q B P からなる請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の抗がん剤感受性判定マーカー。 10
- 【請求項 5】
さらに、C R B P 1 からなる請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗がん剤感受性判定マーカー。
- 【請求項 6】
がん患者由来の生体試料中の T A L D O の量を測定する工程を含む抗がん剤の感受性判定方法。
- 【請求項 7】
さらに、前記測定結果を対照レベルと比較することにより、当該がん患者の抗がん剤に対する感受性を判定する工程を含む請求項 6 記載の判定方法。 20
- 【請求項 8】
生体試料が、抗がん剤を投与されたがん患者由来の生体試料である請求項 6 又は 7 記載の判定方法。
- 【請求項 9】
抗がん剤が、白金錯体系抗がん剤である請求項 6 ~ 8 のいずれかに記載の判定方法。
- 【請求項 10】
抗がん剤が、オキサリプラチン又はその塩から選ばれるものである請求項 6 ~ 9 のいずれかに記載の判定方法。
- 【請求項 11】
さらに、C 1 Q B P の量を測定する工程を含む請求項 6 ~ 10 のいずれかに記載の判定方法。 30
- 【請求項 12】
さらに、C R B P 1 の量を測定する工程を含む請求項 6 ~ 11 のいずれかに記載の判定方法。
- 【請求項 13】
がん患者由来の生体試料中の T A L D O の量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 6 ~ 12 のいずれかに記載の判定方法を実施するためのキット。
- 【請求項 14】
抗がん剤の存在下、がん細胞株又は担癌動物由来の生体試料中の T A L D O の発現変動を指標とする抗がん剤感受性亢進剤のスクリーニング方法。 40
- 【請求項 15】
抗がん剤が、白金錯体系抗がん剤である請求項 14 記載のスクリーニング方法。
- 【請求項 16】
抗がん剤が、オキサリプラチン又はその塩から選ばれるものである請求項 14 又は 15 記載のスクリーニング方法。
- 【請求項 17】
さらに、抗がん剤の存在下、がん細胞株又は担癌動物由来の生体試料中の C 1 Q B P の発現変動を指標とする請求項 14 ~ 16 のいずれかに記載の抗がん剤感受性亢進剤のスクリーニング方法。
- 【請求項 18】 50

さらに、抗がん剤の存在下、がん細胞株又は担癌動物由来の生体試料中のCRBP1の発現変動を指標とする請求項14～17のいずれかに記載の抗がん剤感受性亢進剤のスクリーニング方法。

【請求項19】

請求項14～18のいずれかに記載の方法により得られた抗がん剤感受性亢進剤。

【請求項20】

請求項19記載の感受性亢進剤と、感受性亢進の対象となる抗がん剤とを組み合わせるがん治療用組成物。

【請求項21】

抗がん剤が、白金錯体系抗がん剤である請求項20記載のがん治療組成物。

10

【請求項22】

抗がん剤が、オキサリプラチン又はその塩である請求項20又は21記載のがん治療用組成物。

【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、使用しようとする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利用に関する。

【背景技術】

【0002】

20

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。しかし、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(SP-4-2) - [(1R, 2R) - cyclohexane - 1, 2 - diamine - N, N'] [ethanedioato(2-) - O¹, O²] platinum (IUPAC) は第三世代白金錯体系抗悪性腫瘍薬である。作用機序は先行薬剤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オキサリプラチン(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として承認されており、日本においても2005年4月、「治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌」に対するレボホリナート及びフルオロウラシル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、オキサリプラチンを加えた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、同じくレボホリナート及びフルオロウラシル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。

30

40

【0004】

しかし、それでもなお進行再発大腸癌に対するFOLFOX療法の奏効率は50%程度であり、換言すれば治療を受けた患者の半数は効果が得られていないことを意味する。また、オキサリプラチンの使用により好中球減少症のほか高頻度の末梢神経障害を呈し、これは致命的副作用ではないものの治療継続を困難にする因子ともなっている。したがって、治療開始前に効果の期待できる患者(レスポンドー)と、効果の期待できない患者(ノ

50

ンレスポonder)を予測し、治療反応性を早期に診断できるバイオマーカーにより、有効性と安全性の高い化学療法が実現する。

【0005】

さらに、一般にがん化学療法の治療スケジュールは長期に渡るため、治療継続中における抗がん剤に対する感受性の経時的モニターは治療継続の是非の判定を可能とし、患者負担や副作用軽減につながるのみならず医療経済の観点からも有用であると考えられる。個々の患者における治療反応性を予測、そして早期に診断して適切な薬剤や治療レジメンを選択する「個別化治療」実現のためには、オキサリプラチン等の抗がん剤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。

【0006】

かかる観点から本発明者らは、複数のヒトがん細胞株を培養し、これらのがん細胞株の薬剤感受性を測定し、これら薬剤感受性の異なる細胞株に薬剤を曝露し、薬剤曝露後の細胞内タンパク質の経時的発現変化を、表面エンハンス型レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (SELDI-TOF MS) を用いて網羅的に解析し、薬剤感受性と比較解析することにより、抗がん剤感受性判定マーカーの探索を行い、いくつかのマーカーを報告した (特許文献1~3)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】国際公開第2009/096196号

【特許文献2】国際公開第2011/052748号

【特許文献3】国際公開第2011/052749号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかしながら、先に報告したマーカーは、いまだ抗がん剤の感受性判定マーカーとして実用化されておらず、さらに新たなマーカーの開発が望まれている。

従って、本発明の課題は、さらに新たな抗がん剤感受性判定マーカーを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

そこで本発明者は、まず、がん細胞株を抗がん剤 (オキサリプラチン: L-OHP) に対する感受性の程度によって高感受性、中感受性及び低感受性の3種に分類し、高感受性細胞株と低感受性細胞株において発現しているタンパク質の発現量に差のあるタンパク質を二次元ディフュージョン電気泳動 (2D-DIGE) で検討した。その結果、高感受性細胞株と低感受性細胞株において、細胞内発現レベルの異なるスポットを見出し、そのスポットをLC-MS/MSで解析し、データベース検索することで、10種のタンパク質を同定した。次に、高感受性、中感受性及び低感受性の3種の細胞株でのこれらのタンパク質の発現量と抗がん剤に対するIC₅₀値との相関を確認したところ、Prohibitin (PHB)、Annexin A5 (ANXA5)、Annexin A1 (ANXA1)、Transaldolase (TALDO)、Complement component 1Q subcomponent-binding protein (C1QBP)、及びInorganic Pyrophosphatase (IPYR) の6タンパク質で高い相関が確認されることを見出した。

また、高感受性細胞株と低感受性細胞株において発現しているタンパク質の発現量に差のあるタンパク質を表面エンハンス型レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (SELDI-TOF MS) で検討した。なお、発現量に差のあるタンパク質を広く探索するために、SELDI-TOF MSにおいては、陽イオン用、陰イオン用両方のチップを使用し、マトリックスとして高分子用のSPA (EAM: 50% ACN / 0.5% TFA 溶液による sinapinic acid の飽和溶液) と低分子用のCHCA (- シア

10

20

30

40

50

ノ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸)を用いて検討した。また、細胞内タンパク質抽出工程では、細胞への刺激および細胞内タンパク質の活性化を避けるためにラバーポリスマンで剥がさずそのまま細胞溶解液を用い細胞内タンパク質を抽出した。その結果、高感受性細胞株と低感受性細胞株において、細胞内発現量に違いのあったタンパク質について推定される分子量及び等電点の情報を得た。これらのタンパク質をデータベース検索することで、Cytocrome c oxidase subunit 5A (COX5A)を同定した。また、高感受性細胞株および低感受性細胞株の細胞抽出液の二次元電気泳動を行い、推定される分子量及び等電点の範囲にあり、かつ発現量に差のあるスポットを見出し、そのスポットをLC-MS/MSで解析し、データベースで検索することで、Retinol-binding protein 1 (CRBP1)を同定した。

10

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当該タンパク質の濃度を測定すれば、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、これら物質の発現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。

【0010】

すなわち、本発明は、次の〔1〕～〔16〕の発明を提供するものである。

〔1〕PHB、ANXA5、ANXA1、TALDO、C1QBP、IPYR、CRBP1及びCOX5Aから選ばれる1以上の分子からなる抗がん剤感受性判定マーカー。

20

〔2〕抗がん剤が、白金錯体系抗がん剤である〔1〕記載の抗がん剤感受性判定マーカー。

〔3〕抗がん剤が、オキサリプラチン又はその塩から選ばれるものである〔1〕又は〔2〕記載の抗がん剤感受性判定マーカー。

〔4〕がん患者由来の生体試料中のPHB、ANXA5、ANXA1、TALDO、C1QBP、IPYR、CRBP1及びCOX5Aから選ばれる1以上の分子の量を測定する工程を含む抗がん剤の感受性判定方法。

〔5〕さらに、前記測定結果を対照レベルと比較することにより、当該がん患者の抗がん剤に対する感受性を判定する工程を含む〔4〕記載の判定方法。

〔6〕生体試料が、抗がん剤を投与されたがん患者由来の生体試料である〔4〕又は〔5〕記載の判定方法。

30

〔7〕抗がん剤が、白金錯体系抗がん剤である〔4〕～〔6〕のいずれかに記載の判定方法。

〔8〕抗がん剤が、オキサリプラチン又はその塩から選ばれるものである〔4〕～〔7〕のいずれかに記載の判定方法。

〔9〕がん患者由来の生体試料中のPHB、ANXA5、ANXA1、TALDO、C1QBP、IPYR、CRBP1及びCOX5Aから選ばれる1以上の分子の量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〔4〕～〔8〕のいずれかに記載の判定方法を実施するためのキット。

〔10〕抗がん剤の存在下、がん細胞株又は担癌動物由来の生体試料中のPHB、ANXA5、ANXA1、TALDO、C1QBP、IPYR、CRBP1及びCOX5Aから選ばれる1以上の分子の発現変動を指標とする抗がん剤感受性亢進剤のスクリーニング方法。

40

〔11〕抗がん剤が、白金錯体系抗がん剤である〔10〕記載のスクリーニング方法。

〔12〕抗がん剤が、オキサリプラチン又はその塩から選ばれるものである〔10〕又は〔11〕記載のスクリーニング方法。

〔13〕〔10〕～〔12〕のいずれかに記載の方法により得られた抗がん剤感受性亢進剤。

〔14〕〔13〕記載の感受性亢進剤と、感受性亢進の対象となる抗がん剤とを組み合わせるがん治療用組成物。

50

〔 1 5 〕 抗がん剤が、白金錯体系抗がん剤である〔 1 4 〕記載のがん治療組成物。

〔 1 6 〕 抗がん剤が、オキサリプラチン又はその塩である〔 1 4 〕又は〔 1 5 〕記載のがん治療用組成物。

【発明の効果】

【 0 0 1 1 】

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感受性を治療開始前もしくは治療開始後早期に適確に判定できる結果、治療効果の高い抗がん剤の選択が可能となる。さらに効果が得られない抗がん剤の使用を回避できるため不必要な副作用を回避できる。また、抗がん剤を用いた治療スケジュールは長期に及ぶため、治療継続中においても治療サイクルごとに抗がん剤感受性を判定することにより、そのがんに対する抗がん剤の感受性の経時的評価が可能となり、治療を継続すべきか否かの判定ができる。その結果、治療効果の得られ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、患者の負担軽減、医療費の削減にもつながる。

さらに、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】

【 0 0 1 2 】

【図 1】 2D - D I G E の結果を示す。図中の枠は、選び出した 1 6 スポットを示す。

【図 2】 P H B の発現量とがん細胞に対するオキサリプラチン感受性 (I C ₅₀ 値) の関係を示す。 I C ₅₀ 値は、左から、 S W 4 8 0 、 L s 1 7 4 T 、 L o v o 、 S W 6 2 0 、 H C T 1 1 6 、 H C T 1 5 、 H T 2 9 、 D L D - 1 、 W i D r の結果をプロットしている。

【図 3】 C 1 Q B P の発現量とがん細胞に対するオキサリプラチン感受性 (I C ₅₀ 値) の関係を示す。 I C ₅₀ 値は、左から、 S W 4 8 0 、 L s 1 7 4 T 、 L o v o 、 S W 6 2 0 、 H C T 1 1 6 、 H C T 1 5 、 H T 2 9 、 D L D - 1 、 W i D r の結果をプロットしている。

【図 4】 A N X A 5 の発現量とがん細胞に対するオキサリプラチン感受性 (I C ₅₀ 値) の関係を示す。 I C ₅₀ 値は、左から、 S W 4 8 0 、 L s 1 7 4 T 、 L o v o 、 S W 6 2 0 、 H C T 1 1 6 、 H C T 1 5 、 H T 2 9 、 D L D - 1 、 W i D r の結果をプロットしている。

【図 5】 A N X A 1 の発現量とがん細胞に対するオキサリプラチン感受性 (I C ₅₀ 値) の関係を示す。 I C ₅₀ 値は、左から、 S W 4 8 0 、 L s 1 7 4 T 、 L o v o 、 S W 6 2 0 、 H C T 1 5 、 H T 2 9 、 D L D - 1 、 W i D r の結果をプロットしている。

【図 6】 T A L D O の発現量とがん細胞に対するオキサリプラチン感受性 (I C ₅₀ 値) の関係を示す。 I C ₅₀ 値は、左から、 S W 4 8 0 、 L s 1 7 4 T 、 L o v o 、 S W 6 2 0 、 H C T 1 1 6 、 H C T 1 5 、 H T 2 9 、 D L D - 1 、 W i D r の結果をプロットしている。

【図 7】 I P Y R の発現量とがん細胞に対するオキサリプラチン感受性 (I C ₅₀ 値) の関係を示す。 I C ₅₀ 値は、左から、 S W 4 8 0 、 L s 1 7 4 T 、 L o v o 、 S W 6 2 0 、 H C T 1 1 6 、 H C T 1 5 、 H T 2 9 、 D L D - 1 、 W i D r の結果をプロットしている。

【図 8】 候補タンパク質 A の S E L D I - T O F M S 結果を示す。

【図 9】 候補タンパク質 A の等電点の予測を示す。

【図 10】 候補タンパク質 B の S E L D I - T O F M S 結果を示す。

【図 11】 候補タンパク質 B の等電点の予測を示す。

【図 12】 S E L D I - T O F M S で推定された分子量と等電点を同定するために行った L - O H P 高感受性株と低感受性株に対する二次元電気泳動の結果を示す。

【図 13】 m / z 1 5 , 8 5 0 (C R B P 1) のウエスタンブロットと S E L D I - T O F M S の各種ピーク強度解析結果の比較を示す。

【図 14】 m / z 1 2 , 5 0 6 (C O X 5 A) のウエスタンブロットと S E L D I - T

10

20

30

40

50

OF MSの各種ピーク強度解析結果の比較を示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明における抗がん剤感受性判定マーカーは、PHB、ANXA5、ANXA1、TALDO、C1QB P、IPYR、CRBP1及びCOX5Aの8種のタンパク質である。これらタンパク質は、後記実施例に示すように、抗がん剤に高感受性の細胞株と低感受性の細胞株において発現しているタンパク質の発現量の差を2D-DIGE又はSELDI-TOF MSを用いて検討した結果、PHB、C1QB P、CRBP1及びCOX5Aの4タンパク質では、高感受性株で発現量が増大していることが判明した。また、ANXA5、ANXA1、TALDO及びIPYRの4タンパク質では、低感受性株で発現量が増大していることが判明した。従って、これら8タンパク質は、抗がん剤感受性判定マーカー、特にオキサリプラチンの抗がん剤感受性判定マーカーとして有用である。

10

【0014】

PHBは、がん抑制遺伝子であること(特開平5-271294号公報)、前立腺がんマーカーとして使用できること(特開2012-196211号公報)は知られているが、抗がん剤の感受性判定マーカーとして使用できること、抗がん剤感受性の高いがん細胞でPHBの濃度が上昇することは全く知られていない。

ANXA5およびANXA1は、泌尿生殖管、腸管のがんの診断等に使用され得る(特表2008-545634号公報)が、抗がん剤感受性判定マーカーとして使用できること、抗がん剤感受性の低いがん細胞でANXA5、ANXA1の濃度が上昇することは全く知られていない。

20

TALDOは、がんマーカーについての報告はなく、抗がん剤感受性判定マーカーとして使用できること、抗がん剤感受性の低いがん細胞でTALDOの濃度が上昇することは全く知られていない。

C1QB Pは、腎細胞がんの診断マーカーとして使用できること(特表2006-514554号公報)は知られているが、抗がん剤感受性判定マーカーとして使用できること、抗がん剤感受性の高いがん細胞でC1QB Pの濃度が上昇することは全く知られていない。

IPYRは、in vitroで結腸直腸がんを診断する方法に使用できること(特表2008-502889号公報)は知られているが、抗がん剤感受性判定マーカーとして使用できること、抗がん剤感受性の低いがん細胞でIPYRの濃度が上昇することは全く知られていない。

30

CRBP1は、乳がんや大腸がんにおいてレチノールによる細胞増殖抑制作用を助長すること(Kaleagasioglu F, et al., Arzneimittelforschung(1993)43(4):487-90)は知られているが、抗がん剤感受性判定マーカーとして使用できること、抗がん剤感受性の高いがん細胞でCRBP1の濃度が上昇することは全く知られていない。

COX5Aは、マウス大腸がんモデルにおいて、癌細胞でその発現が正常細胞に比べて低いこと(Yasui Y, et al., J Carcinog(2009)8:10)は知られている。また、前記特許文献3の段落(0068)にて、COX5Aは、タンパク質Gの候補の一つとして挙げられている。しかし、特許文献3においてタンパク質Gは、抗がん剤低感受性細胞株で高感受性株に比べてその濃度が上昇しており、本願とは逆の結果を示しているため、特許文献3のタンパク質GはCOX5Aでないと考えられる。このため、COX5Aが、抗がん剤感受性判定マーカーとして使用できること、抗がん剤感受性の高いがん細胞でCOX5Aの濃度が上昇することは全く知られていないと言える。

40

【0015】

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としては特に限定されないが、例えばオキサリプラチン、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(

50

nimustine)、ラニムスチン(ranimustine)、ダカルバジン(dacarbazine)、プロカルバジン(procarbazine)、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)、フルオロウラシル(fluorouracil)、テガフル/ウラシル(tegaful·uracil)、ドキシフルリジン(doxifluridine)、テガフル/ギメラシル/オテラシル(tegaful·gimeracil·oteracil)、カペシタビン(capecitabine)、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(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(mytomicin 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 trioxide)、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。このうち白金錯体系抗がん剤が好ましく、特にオキサリプラチン又はその塩が好ましい。

【0016】

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、がん患者由来の生体試料(検体)中のPHB、ANXA5、ANXA1、TALDO、C1QB P、IPYR、CRBP1及びCOX5Aから選ばれる1以上の分子の量を測定すること、詳細にはさらに当該測定結果を対照レベル(標準濃度、抗がん剤投与前の本発明の抗がん剤感受性判定マーカーの濃度等)と比較すること、により行うことができる。

ここで、がん患者としては、がんを有する被験者又はがんを有していた被験者が包含される。生体試料としては、例えば血液、血清、血漿、がん組織生検検体、がん摘出手術標本、便、尿、腹水、胸水、脳脊髄液、喀痰等が挙げられるが、血清が特に好ましい。

【0017】

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、膵がん、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、特に胃がん、膵がん及び大腸がん（結腸・直腸がん）に対して好適に利用でき、特に大腸がん好適に利用できる。

【0018】

検体中のPHB、ANXA5、ANXA1、TALDO、C1QBP、IPYR、CRBP1及びCOX5Aから選ばれる分子の測定手段は、例えば電気泳動法（2D-DIGEなど）、質量分析法（SELDI-TOF MS、LC/MS、LC/MS/MSなど）、免疫学的測定法（イムノプロッティング、ELISAなど）等により測定可能である。

10

【0019】

ここで2D-DIGE及びSELDI-TOF MSによる測定は後記実施例に記載の方法によって行うことができる。また、LC/MS、LC/MS/MSなどの質量分析法による測定は、PHB、ANXA5、ANXA1、TALDO、C1QBP、IPYR、CRBP1及びCOX5Aから選ばれる分子を、常法に従って定量分析することによって測定することができる。また、免疫学的測定法においては、PHB、ANXA5、ANXA1、TALDO、C1QBP、IPYR、CRBP1及びCOX5Aから選ばれる分子に対する抗体を用いる測定法が好ましい。用いるPHB、ANXA5、ANXA1、TALDO、C1QBP、IPYR、CRBP1及びCOX5Aから選ばれる分子に対する抗体は、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよい。より具体的には、例えば、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、発光イムノアッセイ、免疫沈降法、免疫比濁法、ウエスタンブロット、免疫染色、免疫拡散法などを挙げることができるが、好ましくはウエスタンブロット又はエンザイムイムノアッセイであり、特に好ましいのはウエスタンブロット、酵素結合免疫吸着定量法（enzyme-linked immunosorbent assay：ELISA）（例えば、sandwich ELISA）である。

20

30

【0020】

ANXA5、ANXA1、TALDO及びIPYRは、対象とする抗がん剤がオキサリプラチン又はその塩である場合、抗がん剤に対する感受性を判定するには、抗がん剤投与前又は投与後早期の段階において、がん患者由来の生体試料中のANXA5、ANXA1、TALDO及び/又はIPYRの量、例えば濃度を測定すればよい。濃度が所定の標準濃度より低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であると判定できるため、これら抗がん剤感受性判定マーカーは、治療効果を期待出来る患者に対して積極的に治療を継続するためのマーカーとして使用できる。一方、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行われたり、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、治療効果を期待出来る患者に対して積極的に治療を継続するためのマーカーとして使用できるのに加え、薬効の期待できない抗がん剤の継続投与に伴うがんの進行や副作用の増大を回避するためのマーカーとしても使用できる。

40

【0021】

PHB、C1QBP、CRBP1及びCOX5Aは、対象とする抗がん剤がオキサリプラチン又はその塩である場合、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

50

又は投与後早期の段階において、がん患者由来の生体試料中のPHB、C1QBP、CRBP1及び/又はCOX5Aの量、例えば濃度を測定すればよい。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であると判定できるため、これら抗がん剤感受性判定マーカーは、治療効果を期待出来る患者に対して積極的に治療を継続するためのマーカーとして使用できる。一方、濃度が所定の標準濃度より低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行われたり、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、治療効果を期待出来る患者に対して積極的に治療を継続するためのマーカーとして使用できるのに加え、薬効の期待できない抗がん剤の継続投与に伴うがんの進行や副作用の増大を回避するためのマーカーとしても使用できる。

10

20

30

40

50

【0022】

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PHB、ANXA5、ANXA1、TALDO、C1QBP、IPYR、CRBP1及びCOX5Aから選ばれる1以上の分子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、PHB、ANXA5、ANXA1、TALDO、C1QBP、IPYR、CRBP1及びCOX5Aから選ばれる1以上の分子の測定試薬、及びプロトコール(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、PHB、ANXA5、ANXA1、TALDO、C1QBP、IPYR、CRBP1及びCOX5Aから選ばれる1以上の分子の標準濃度、高いと判断される濃度、低いと判断される濃度、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。

【0023】

また、抗がん剤の存在下、がん細胞株又は担癌動物由来の生体試料中のPHB、ANXA5、ANXA1、TALDO、C1QBP、IPYR、CRBP1及びCOX5Aから選ばれる1以上の分子の発現変動を指標とすることにより抗がん剤感受性亢進剤のスクリーニングが可能となる。

すなわち、がん細胞株又は担癌動物に抗がん剤及び試験物質を添加又は投与し、がん細胞株又は担癌動物由来の生体試料中のPHB、ANXA5、ANXA1、TALDO、C1QBP、IPYR、CRBP1及びCOX5Aから選ばれる1以上の分子の発現量を遺伝子レベル又はタンパク質レベルで測定する工程、及び当該発現量の変動に基づいて、前記がん細胞株又は担癌動物の前記抗がん剤に対する感受性を亢進する試験物質を選択する工程を行うことにより、前記抗がん剤に対する感受性亢進剤をスクリーニングすることができる。

【0024】

例えば、ANXA5、ANXA1、TALDO及びIPYRについて、対象とする抗がん剤がオキサリプラチン又はその塩である場合、これらのタンパク質の発現変動、具体的には発現抑制を指標とすれば、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*においてこれらのタンパク質の発現を抑制する物質は、抗がん剤感受性を亢進する。例えば、*in vitro*では、各種がん細胞株において抗がん剤の存在下でこれらのタンパク質の濃度を低下させる物質は、当該がん細胞株の当該抗がん剤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*では、担癌動物における抗がん剤投与前後において、これらのタンパク質の濃度を低下させる物質は、当該担癌動物の当該抗がん剤感受性を亢進する物質(抗がん剤感受性亢進剤)である。

【0025】

また、例えば、PHB、C1QBP、CRBP1及びCOX5Aについて、対象とする

抗がん剤がオキサリプラチン又はその塩である場合、これらのタンパク質の発現変動、具体的には発現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*においてこれらのタンパク質の発現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*では、各種がん細胞株において抗がん剤の存在下でこれらのタンパク質の濃度を上昇させる物質は、当該がん細胞株の当該抗がん剤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*では、担癌動物における抗がん剤投与前後において、これらのタンパク質の濃度を上昇させる物質は、当該担癌動物の当該抗がん剤感受性を亢進する物質（抗がん剤感受性亢進剤）である。

【0026】

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としては、前記と同様であり、オキサリプラチン、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)、フルオロウラシル(flurouracil)、テガフル/ウラシル(tegafur・uracil)、ドキシフルリジン(doxifluridine)、テガフル/ギメラシル/オテラシル(tegafur・gimeracil・oteracil)、カペシタビン(capecitabine)、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)、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(bo

10

20

30

40

50

rtezomib)、エルロチニブ(erlotinib)、セツキシマブ(cetuximab)、ベパシズマブ(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)、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。このうち白金錯体系抗がん剤が好ましく、特にオキサリプラチン又はその塩が好ましい。

【実施例】

【0027】

次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明する。

10

【0028】

試験例 1

ヒト大腸癌細胞株のオキサリプラチン感受性の測定

(1) 方法

(a) 使用細胞

ヒト大腸癌細胞株 9 種類 (SW480、Ls174T、Lovo、SW620、HCT116、HCT15、HT29、DLD-1 及び WiDr) は、以下 (表 1) より入手した。

培養は、100mm/Tissue Culture Dish (IWAKI)、培地 (D-MEM、2mM Glutamine、10% Fetal Bovine Serum)、37、5% CO₂ の条件下にて行った。

20

【0029】

【表 1】

ヒト大腸癌細胞株 9 種類

細胞株名	細胞株 入手元バンク	寄託 (もしくは購入先)	資源番号 など	ロット番号 など
SW480	ECACC	大日本住友製薬株式会社	EC-87092801	02/A/063
Ls174T	TKG	東北大学加齢医学研究所 医用細胞資源センター	TKG0406	I-4468
Lovo	ECACC	大日本住友製薬株式会社	EC-8706101	—
SW620	ATCC	住商ファーマ インターナ ショナル株式会社	CCL-227	2324584
HCT116	ATCC	株式会社ヤクルト本社	CCL-247	—
HCT15	TKG	東北大学加齢医学研究所 医用細胞資源センター	TKG0504	I-4608
HT29	ATCC	株式会社ヤクルト本社	HTB-38	—
DLD-1	ECACC	大日本住友製薬株式会社	EC-90102540	00/J/025
WiDr	ECACC	大日本住友製薬株式会社	EC-85111501	00/H/001

30

40

【0030】

(b) 薬剤

50

オキサリプラチン (L - O H P) 原末は、和光純薬工業および株式会社ヤクルト本社より入手した。

【 0 0 3 1 】

(c) ヒト大腸癌細胞株のオキサリプラチン感受性の測定方法

前記 9 種類のヒト大腸癌細胞株を、 9 6 w e l l プレートに 1 5 0 0 個 / w e l l 播種し、 2 4 時間後にオキサリプラチンを添加した。薬剤曝露 4 8 時間後の細胞生存率を M T S a s s a y (C e l l T i t e r 9 6 ^{T M} A Q u e o u s O n e S o l u t i o n C e l l P r o l i f e r a t i o n A s s a y , P r o m e g a) にて評価し、吸光度から $I C_{50}$ 値を求めた。薬剤曝露条件は Control (0 μ M)、 0 . 0 0 1 μ M、 0 . 0 1 μ M、 0 . 1 μ M、 0 . 3 μ M、 1 μ M、 3 μ M、 1 0 μ M、 3 0 μ M、 1 0 0 μ M、 1 0 0 0 μ M の 1 1 条件を用いた。感受性の評価は、 1 回の試験においてそれぞれの細胞株、薬剤曝露時間、薬剤曝露条件について 3 サンプルずつ測定し、異なる継代数の細胞にて 3 回実施した。解析は、 M T S a s s a y の結果から算出した生存率をもとに行った。

10

【 0 0 3 2 】

(2) 結果

$I C_{50}$ 値は、表 2 に示す値となった。表 2 より、 S W 4 8 0、 L s 1 7 4 T 及び L o v o をオキサリプラチン高感受性株、 S W 6 2 0、 H C T 1 1 6 及び H C T 1 5 をオキサリプラチン中感受性株、 H T 2 9、 D L D - 1 及び W i D r をオキサリプラチン低感受性株と分類した。

20

【 0 0 3 3 】

【表 2】

大腸癌細胞株	$I C_{50}$ 値 (μ M)
SW480	0.43 ± 0.13
Ls174T	0.61 ± 0.11
Lovo	0.79 ± 0.18
SW620	1.14 ± 0.74
HCT116	1.15 ± 0.34
HCT15	1.45 ± 0.44
HT29	7.99 ± 2.66
DLD-1	13.88 ± 6.29
WiDr	17.71 ± 8.39

30

40

【 0 0 3 4 】

実施例 1

2 D - D I G E によるオキサリプラチン感受性予測バイオマーカーの探索

(1) 使用細胞

試験例 1 にてオキサリプラチン高感受性株として分類した S W 4 8 0、 L s 1 7 4 T 及び L o v o、並びにオキサリプラチン低感受性株として分類した H T 2 9、 D L D - 1 及び W i D r を使用した。

【 0 0 3 5 】

(2) 細胞内タンパク質抽出方法

50

dishより培地を除き氷冷PBSで3回洗浄後、細胞への刺激および細胞内タンパク質の活性化を避けるために、直接細胞溶解液(2M thiourea, 7M Urea, 4% CHAPS, 50mM Tris-HCl pH9)を加え細胞を溶解し、1.5mLマイクロチューブに移した。氷冷下で超音波破碎処理を行った後、4にて13,000rpm、10分間遠心して上清を回収した。2D Quant kit (GE Healthcare)を使用して、タンパク質定量を行い、細胞溶解液で5mg/mLに調製した後、分注して分析するまで-80にて保存した。

【0036】

(3) CyDye™ DIGE Fluor minimal dyesによるタンパク質の標識

CyDye DIGE fluors, minimal labeling kit (GE Healthcare)を使用して細胞内タンパク質を標識した。それぞれの細胞溶解液50μgに対し400pmolの試薬(Cy2、Cy3、Cy5)で標識し、十分に混和した。遠心機で軽く遠心し、4暗所で30分間静置した。10mMリジンを添加し反応を停止した。溶液を混和し、軽く遠心して4暗所で10分間静置した。使用まで-80にて保存した。

【0037】

(4) 等電点電気泳動(一次元目)

各ゲルにアプライしたサンプルを表3に示す。

内部標準は全ての細胞溶解液を等量ずつ混和したものを使用した。

それぞれのゲル用に、(3)で標識したタンパク質サンプルを50μg(12μL)ずつ1.5mLマイクロチューブに入れ、混和した。36μLの2xサンプルバッファー(2M thiourea、7M urea、4% CHAPS、2% Pharmalyte pH3-10、2% Destreak Reagent)を混和したタンパク質サンプルに添加し、氷上で10分間静置した。各サンプル150μg溶液を膨潤液(2M thiourea、7M urea、4% CHAPS、2% Pharmalyte pH3-10、1% Destreak Reagent)で450μLに調整し、4にて13,000rpm、10分間遠心した。各ストリップホルダーにサンプルの上清を450μL加え、Immunobiline DryStrip pH3-10NL, 24cm (GE Healthcare)をストリップホルダーに設置した後、Ettan IPGphor2を使用して、等電点電気泳動を行った。等電点電気泳動の条件を表4に示す。

【0038】

10

20

30

【表 3】

gel. no	Cy2	Cy3	Cy5
1	内部標準	SW480	HT29
2	内部標準	Ls174T	DLD-1
3	内部標準	Lovo	WiDr
4	内部標準	DLD-1	SW480
5	内部標準	WiDr	LS174T
6	内部標準	HT29	Lovo

10

【 0 0 3 9 】

20

【表 4】

Rehydrate				
10Hr				
20℃				
step	電圧変化パターン	電圧 (V)	時間 (hr)	kVhr
1	Step and Hold	500	1:00	0.5
2	Gradient	1000	1:00 (8:00)	0.8 (0.6)
3	Gradient	8000	3:00	13.5
4	Step and Hold	8000	2:30-3:45	20-30
5	Step and Hold	500	2:00	

30

40

【 0 0 4 0 】

(5) SDS - PAGE (二次元目)

SDS - PAGE用に24cmの15%アクリルアミドゲルを作成した。二次元目泳動済みのImmunobiline DryStripを10cm dishに入れ、平衡化バッファ-A(50mM Tris-HCl pH8.8、6M Urea、30%グリセロール、1%SDS、0.25%DTT、BPB)で満たし15分間振盪しながら平

50

平衡化させた。平衡化バッファーB (50 mM Tris-HCl pH 8.8、6 M Urea、30%グリセロール、1% SDS、4.5%ヨードアセトアミド、BPB) に変え15分間振盪しながら平衡化させた。平衡化したImmunobiline Dry StripをSDS-PAGE用ゲルに設置し、泳動層(Tris/Tricine/SDS buffer)にて7mAで泳動した。

Typhoon Trio (GE Healthcare) で撮影し、DeCyder 2D Software Ver 6.5 (GE Healthcare) で解析し、 $P < 0.001$ で、かつ、発現量の差が1.3倍以上のスポットを解析した。

【0041】

(6) スポットの回収

10

標識していない内部標準150 μg を(4)、(5)同様に二次元電気泳動した。

次に(5)で得られたスポットを回収するために、ゲルをPlusOne™ Silver Staining Kit, Protein (GE Healthcare) で銀染色した。

まず、ゲルにFixing solution (30% Ethanol、10% Glacial acetic acid) を250 mL添加し、60分間静置した。この作業を2回繰り返して、ゲルを固定した。固定したゲルに、Sensitizing solution (30% Ethanol、4% Sodium Thiosulphate (5% w/v)、6.8% Sodium acetate) を250 mL添加して120分間静置することでゲルを増感させ、Milli-Q™水により、8分間洗浄し、当該洗浄を5回繰り返した。洗浄したゲルに、Silver solution (10% Silver nitrate solution (2.5% w/v)) を250 mL添加して60分間銀反応させ、Milli-Q水にて1分間洗浄し、当該洗浄を4回繰り返した。洗浄後のゲルにDeveloping solution (2.5% Sodium carbonate、0.08% formaldehyde (37% w/v)) を250 mL添加して、2~5分間現像し、Stop solution (1.46% EDTA-Na₂·2H₂O) を250 mL添加して、45分間静置し、反応を止めた。Milli-Q水で30分間洗浄し、当該洗浄を2回繰り返した後、解析する目的のスポットをスポットペッカー (Gene World) で採取し、1.5 mLマイクロチューブに4スポットずつ移した。

20

30

【0042】

(7) スポットの解析

(6)までの操作で回収された16スポット(図1の枠)について、公知の方法に従ってタンパク質のゲル内トリプシン消化を行った後、LCMS-IT-TOF (液体クロマトグラフ質量分析計、Shimadzu) を用いて分析(MS/MS測定)を行い、得られた結果についてMASCOTデータベース検索を行った。

【0043】

データベース検索の結果、Prohibitin (PHB)、Annexin A5 (ANXA5)、Annexin A1 (ANXA1)、Transaldolase (TALDO)、Complement component 1Q subcomponent-binding protein (C1QBP)、及びInorganic Pyrophosphatase (IPYR) の6種類が同定された。

40

【0044】

実施例 2

6タンパク質の大腸癌細胞株中での発現量とIC₅₀値との相関

実施例1にて同定された6タンパク質について、試験例1にて使用した9種類の大腸癌細胞株中での発現量と試験例1で算出したIC₅₀値との相関を確認した。

【0045】

(1) 方法

(a) 使用細胞

50

試験例 1 記載の 9 種類の大腸癌細胞株を使用した。

(b) 細胞内タンパク質の抽出

dishより培地を除き氷冷PBSで3回洗浄後、細胞への刺激および細胞内タンパク質の活性化を避けるために、直接細胞溶解液(9M Urea, 2% CHAPS, 50mM Tris-HCl pH9)を加え細胞を溶解し、1.5mLマイクロチューブに移した。氷冷下で超音波破碎処理を行った後、4にて13,000rpm、10分間遠心して上清を回収した。BCA Protein Assay Kit (Thermo)を使用して、タンパク質定量を行い、細胞溶解液で5mg/mLに調製した後、分注して分析するまで-80にて保存した。

【0046】

(c) Western blotting

10%アクリルアミドゲルに試験例1記載の9種類の大腸癌細胞株をそれぞれ10μL/Lane(50μg/Lane)添加し、泳動層(Tris/Glycin/SDS buffer)にて、1枚20mMでSDS-PAGEを行った。セミドライ式プロッター(BIO-RAD)を用い1枚当たり72mA、30分間にて、PVDF膜(GE-Healthcare)にtransferを行い、5% skim milk/TBS-T(Tris Buffered Saline with Tween20)を用い室温で一時間blockingし、表5に示した一次抗体を添加し、4、overnightで反応させた。

【0047】

【表5】

一次抗体名	購入先	添加量
Prohibitin - mitochondrial marker rabbit polyclonal	abcam, ab28172	×1/10000
Annexin A5 rabbit polyclonal	abcam, ab14196	×1/5000
Annexin A1 [5E4/1] mouse monoclonal	abcam, ab2487	×1/200
Transaldolase 1 mouse polyclonal	abcam, ab67467	×1/200
Complement component 1 Q - binding protein goat polyclonal	santa cruz, sc-10258	×1/10000
Pyrophosphatase 1 rabbit polyclonal	abcam, ab96099	×1/10000
GAPDH mouse monoclonal (6C5)	santa cruz, sc-32233	×1/10000

【0048】

TBS-Tで3回洗浄後、表6に示す二次抗体を添加し、室温で一時間振盪させた。TBS-Tで洗浄後、ELC Prime Western Blotting Detection(GE Healthcare)を反応させ、LAS4000 mini(GE Healthcare)で撮影し解析した。

【0049】

10

20

30

40

【表 6】

二次抗体名	購入先	添加量
anti-mouse IgG	GE Healthcare	×1/20000
anti-rabbit IgG	GE Healthcare	×1/20000
anti-goat IgG	Abcam	×1/20000

10

【0050】

(2) 結果

PHB及びC1QBPは、オキサリプラチン高感受性株でその発現量が多く、低感受性株で発現量が少なく、高い正の相関を示した(図2、図3)。

ANXA5、ANXA1、TALDO及びIPYRは、オキサリプラチン高感受性株でその発現量が少なく、低感受性株で発現量が多く、高い負の相関を示した(図4~図7)。

【0051】

実施例3

SELDI-TOF MSを用いたオキサリプラチン感受性予測バイオマーカーの探索

20

(1) 方法

(a) 使用細胞

試験例1にてオキサリプラチン高感受性株として分類したSW480、Ls174T及びLovo、並びにオキサリプラチン低感受性株として分類したHT29、DLD-1及びWidrを使用した。

【0052】

(b) 細胞内タンパク質の抽出

実施例2の(1)方法(b)細胞内タンパク質の抽出、と同様の方法で行った。

【0053】

(c) タンパク質発現解析のためのサンプル調製及びプロテインチップの作製、細胞内タンパク質の発現解析

30

細胞溶解バッファーをpH4の希釈/洗浄バッファー(50mM sodium acetate buffer)(以下、pH4バッファー)にて0.5mg/mLに調製したサンプル100μLを、pH4バッファーにて前処理した陽イオン交換チップアレイ(CM10、Bio-Rad)のスポットにapplyし、30分インキュベートして反応させた後、pH4バッファーにて3回洗浄、milliQ水にて2回リンスした。風乾後、energy absorbing molecule(高分子側の確認用としてSPA(EAM:50%ACN/0.5%TFA溶液によるsinapinic acidの飽和溶液)を、低分子側の確認用としてCHCA(-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸)を使用)1.0μLを、0.5μLずつ2回に分けて各スポットにapplyし、スポット表面が乾いた後、プロテインチップアレイの分析を行った。

40

また、前記同様に、pH8の希釈/洗浄バッファー(50mM Tris-HCl buffer)(以下、pH8バッファー)にて0.5mg/mLに調製したサンプル100μLを、pH8バッファーにて前処理した陰イオン交換チップアレイ(Q10、Bio-Rad)のスポットにapplyし、1時間インキュベートして反応させた後、pH8バッファーにて3回洗浄、Milli-Q水にて2回リンスした。風乾後、energy absorbing molecule(EAM及びCHCAを使用)1.0μLを、0.5μLずつ2回に分けて各スポットにapplyし、スポット表面が乾いた後、プロテインチップアレイの分析を行った。

タンパク質発現解析は、表面エンハンス型レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計

50

(surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: SELDI-TOF MS)にて行った。分析機器としては、ProteinChipTM Reader (Model PCS4000 Personal Edition、Bio-Rad)を用いた。

マトリックスとしてSPAを使用した場合、Mass Range 10,000~50,000 Daltons、Focus Mass 18,000 Dalton、Energy 4,000 nJ、1サンプルあたり合計265shotsの条件にて分析を行った。

マトリックスとしてCHCAを使用した場合、Mass Range 2,000~20,000 Daltons、Focus Mass 7,700 Dalton、Energy 1,500 nJ、1サンプルあたり合計265shotsの条件にて分析を行った。

signal-to-noise ratio (S/N比) 5以上のピークの抽出とタンパク質発現比較解析は、Ciphergen ExpressTM Data Manager 3.0を用いて行った。

【0054】

(d) 候補ピークの選択

オキサリプラチン高感受性株と低感受性株のタンパク質ピークを比較した際に、 $p < 0.001$ で発現量に違いのあったピークを最終的に2種類抽出した(候補タンパク質A及びB)。また、pHの変動による発現量の変動から候補タンパク質A及びBの等電点を推定した。

【0055】

(2) 結果

チップとしてCM10を使用した際に見出された候補タンパク質Aは、図8に示すように、オキサリプラチン高感受性株で低感受性株に比べ発現量が増加していた。候補タンパク質Aは、オキサリプラチン高感受性株と低感受性株のタンパク質ピークを比較した際のp値は、 $p = 7.9 \times 10^{-6}$ であり、 m/z 15847 Da、等電点(PI) 4.5~5.5(図9)であった。

また、チップとしてQ10を使用した際に見出された候補タンパク質Bは、図10に示すように、オキサリプラチン高感受性株で低感受性株に比べ発現量が増加していた。候補タンパク質Bは、オキサリプラチン高感受性株と低感受性株のタンパク質ピークを比較した際のp値は、 $p = 1.0 \times 10^{-4}$ であり、 m/z 12506 Da、等電点(PI) 4.0~5.0(図11)であった。

【0056】

前記で得られた候補タンパク質Bについて、SELDI-TOF MS解析で得られた分子量と等電点から、データベース(Swiss Prot; スイス生物情報科学機構)を使用してタンパク質Bを推測した結果、cytochrome c oxygenase subunit Va (COX5A) (分子量12,501、等電点4.88)が候補タンパク質Bと推定された。

【0057】

実施例4

候補タンパク質Aの二次元電気泳動による解析

候補タンパク質Aの同定を目的として、さらに二次元電気泳動による解析を行った。

オキサリプラチン高感受性株であるSW480及び低感受性株であるWiDrを用いて、実施例2の(1)方法(b)細胞内タンパク質の抽出と同様の方法で細胞内タンパク質を抽出し、5mg/mLに調整した後、分析するまで-80℃にて保存した。

細胞溶解液50µgを膨潤液(2M thiourea、7M urea、4% CHAPS、2% Pharymalyte pH3-10、1% Destreak Reagent)で125µLに調整した。調整したサンプル溶液を4℃にて13,000rpm

10

20

30

40

50

、10分間遠心し、上清をImmobiline DryStrip gel (pH 3 ~ 10 non linear、13 cm、GEヘルスケア バイオサイエンス)に添加し、ゲルの膨潤を行った後、等電点電気泳動を行った。電気泳動の条件を表7に示す。

【0058】

【表7】

step	電圧変化パターン	電圧 (V)	時間 (hr)	kVhr
1	Step and Hold	300	0:30	0.2
2	Gradient	1000	0:30	0.3
3	Gradient	5000	1:20	4
4	Step and Hold	5000	0:50	
5	Step and Hold	500	2:00	

10

【0059】

等電点電気泳動終了後、Immobiline DryStrip gelを10 mLチューブに入れ、平衡化バッファA (50 mM Tris-HCl pH 8.8、6 M Urea、30%グリセロール、1% SDS、0.25% DTT、BPB)で満たし15分間振盪しながら平衡化させた。平衡化バッファB (50 mM Tris-HCl pH 8.8、6 M Urea、30%グリセロール、1% SDS、4.5% ヨードアセトアミド、BPB)に変え15分間振盪しながら平衡化させた。平衡化の終了したImmobiline DryStrip gelを20 mAの定電流にて電気泳動を行った。ゲルは10~20%、16×16 cmポリアクリルアミドグラジエントゲル(バイオクラフト)を用いた。

20

次に得られたスポットを回収するために、ゲルをPlusOne Silver Staining Kit, Protein (GE Healthcare)で銀染色した。銀染色によるスポットの回収は、実施例1(6)スポットの回収、と同様の方法で行った。

30

実施例3で得られた候補タンパク質Aに関する情報(分子量及び等電点)に基づき、二次元電気泳動にて展開したゲル上の分子量10,000~30,000 Da及び、およそpH 4.5~6.5の範囲に分離されたスポット(図12の枠内)を対象とし、これらの中からSW480とWidrを比較した際に発現量に差のある8スポットを選択し、これらのスポットを回収した。

【0060】

回収したスポットについて、公知の方法に従ってタンパク質のゲル内トリプシン消化を行った後、LCMS-IT-TOF(液体クロマトグラフ質量分析計、Shimadzu)を用いて分析(MS/MS測定)を行い、得られた結果についてMASCOTデータベース検索を行った。

40

【0061】

データベース検索の結果、Cellular retinol binding protein 1 (CRBP1)(分子量15,850、等電点4.99)が同定された。これは、分子量、等電点ともにほぼ一致することから、候補タンパク質Aと推定された。

【0062】

実施例5

Western blotによるタンパク質発現の確認

(1) CRBP1の確認

実施例2の(1)方法(b)細胞内タンパク質の抽出と同様の方法で、オキサリプラチン高感受性株と低感受性株の細胞内タンパク質を抽出後、15%ポリアクリルアミドゲル

50

に1レーンあたりタンパク量50 μ gをapplyし、20mA定電流にてSDS-PAGEを行った。泳動後、ドライプロットシステム(iBlot™、Invitrogen)を用いてPVDF膜にタンパク質をプロットし、ブロッキングを行った後、抗CRBP1モノクローナル抗体(sc-53989、Santa Cruz)($\times 1/200$)を、内在性タンパク質については抗GAPDHモノクローナル抗体(anti-GAPDH monoclonal antibody、Ambion)($\times 1/1000$)を用いて一次抗体反応を行った。アルカリホスファターゼ標識抗マウスIgG抗体($\times 1/20000$)と二次抗体反応をさせた後、反応基質としてCDP-Star™ chemiluminescent substrateを添加して発光させ、ルミノ・イメージアナライザー(LAS-4000 mini、富士フィルム)により検出した。ブロッキング試薬、二次抗体および反応基質はChemiluminescent Western Blot Immunodetection Kit(WesternBreeze™、Invitrogen)を用いた。

10

【0063】

オキサリプラチン高感受性株におけるCRBP1の発現は、抗CRBP1抗体を用いたウエスタンブロット法によって確認された(図13)。

【0064】

(2) COX5Aの確認

一次抗体として、抗COX5Aモノクローナル抗体(sc-376907、Santa Cruz)($\times 1/200$ 添加)を使用した以外は、前記(1)CRBP1の確認と同様の方法で行った。その結果、オキサリプラチン高感受性株におけるCOX5Aの発現は、抗COX5A抗体を用いたウエスタンブロット法によって確認された(図14)。

20

【0065】

実施例6

siRNAの導入によるヒト大腸癌細胞株のオキサリプラチン感受性の変化

(1) 方法

(a) 使用細胞

試験例1記載の9種類の大腸癌細胞株のオキサリプラチン高感受性株としてLs174Tを、中感受性株としてHCT116を、低感受性株としてHT29及びDLD-1を使用した。

30

【0066】

(b) 薬剤

試験例1記載のオキサリプラチン原末を使用した。

【0067】

(c) ヒト大腸癌細胞株へのsiRNAの導入

前記ヒト大腸癌細胞株を、6wellのプレートに 1×10^5 個/well播種し、24時間後に無血清のDMEM培地(Wako, 044-29765)に交換した。1wellあたり、150pmolの表8に示した各siRNAを250 μ L OptiMEM(GIBCO, No. 319985)に溶解した溶液、及び4.5 μ LのLipofectamin RNAiMAX Reagent(invitrogen, No. 13778-150)と250 μ L OptiMEM(GIBCO, No. 319985)を混合した溶液を混合し、10~20分間インキュベートした。インキュベート後、ヒト大腸癌細胞株を培養した6wellプレートの各wellに500 μ Lずつ添加し、添加して4~6時間後に各wellを、血清を添加したDMEM培地(Wako, 044-29765)に交換した。siRNA添加後24時間後に細胞を回収した。

40

また、使用したヒト大腸癌細胞株と導入したsiRNAの組み合わせを表9に示した。なお、Control siRNAは、life technologies社のNo. 4390843を使用した。

【0068】

【表 8】

siRNA名	配列 (5'→3')	配列番号
PHB siRNA	CGUGGGUACAGAAACCAAUtt (life technologies, s1 0424)	配列番号 1
ANXA5 siRNA	GUACAUGACUUAUAUCAGGAtt (life technologies, s1 392)	配列番号 2
TALDO siRNA	UGCUAUUGAUAAACUUUUUtt (life technologies, s1 3776)	配列番号 3
C1QBP siRNA	GGCCUUAUAUGACCACCUAtt (life technologies, s2 139)	配列番号 4
IPYR siRNA	GGAAUCAGUUGCAUGAAUAtt (life technologies, s1 0878)	配列番号 5

10

20

【 0 0 6 9 】

【表 9】

siRNA名	siRNAを導入したヒト大腸癌細胞株名
PHB siRNA	L s 1 7 4 T、HCT 1 1 6、HT 2 9、DLD-1
ANXA5 siRNA	HCT 1 1 6、HT 2 9
TALDO siRNA	L s 1 7 4 T、HCT 1 1 6、HT 2 9
C1QBP siRNA	HCT 1 1 6
IPYR siRNA	L s 1 7 4 T

30

【 0 0 7 0 】

(d) siRNAを導入したヒト大腸癌細胞株のオキサリプラチン感受性の測定方法

試験例 1 (1) (c) 記載の方法で、siRNAを導入したヒト大腸癌細胞株のオキサリプラチン感受性の測定 (IC₅₀ 値の測定) を行った。

40

【 0 0 7 1 】

(2) 結果

(a) PHB siRNA

結果を表 10 に示す。siRNA 導入により、PHB をノックアウトした L s 1 7 4 T、HCT 1 1 6、HT 2 9、DLD-1 の各ヒト大腸癌細胞株は、それぞれの Control siRNA と比較して、IC₅₀ 値が上昇し、オキサリプラチンに対する感受性が低下した。この結果は、PHB がオキサリプラチン高感受性株で発現量が多く、低感受性株で発現量が少ないことを示した実施例 2 の結果とも一致した。

【 0 0 7 2 】

【表 10】

siRNAを導入したヒト 大腸癌細胞株名	siRNA名	IC ₅₀ 値 (μM)	有意差 (p)
L s 1 7 4 T	Control siRNA	0.86	0.033*
	PHB siRNA	11.87	
HCT 1 1 6	Control siRNA	1.72	0.042*
	PHB siRNA	21.48	
HT 2 9	Control siRNA	16.14	0.029*
	PHB siRNA	41.90	
DLD-1	Control siRNA	14.68	0.017*
	PHB siRNA	52.34	

*: $p < 0.05$

【0073】

(b) ANXA5 siRNA

結果を表11に示す。siRNA導入によりANXA5をノックアウトしたHCT116、HT29の各ヒト大腸癌細胞株は、それぞれのControl siRNAと比較して、IC₅₀値が低下し、オキサリプラチンに対する感受性が亢進した。この結果は、ANXA5がオキサリプラチン高感受性株で発現量が少なく、低感受性株で発現量が多いことを示した実施例2の結果とも一致した。

【0074】

【表 11】

siRNAを導入したヒト 大腸癌細胞株名	siRNA名	IC ₅₀ 値 (μM)	有意差 (p)
HCT 1 1 6	Control siRNA	1.39	0.022*
	ANXA5 siRNA	0.76	
HT 2 9	Control siRNA	16.14	0.027*
	ANXA5 siRNA	5.35	

【0075】

(c) TALDO siRNA

結果を表12に示す。siRNA導入によりTALDOをノックアウトしたLs174T、HCT116、HT29の各ヒト大腸癌細胞株は、それぞれのControl siRNAと比較して、IC₅₀値が低下し、オキサリプラチンに対する感受性が亢進した。この結果は、TALDOがオキサリプラチン高感受性株で発現量が少なく、低感受性株で発現量が多いことを示した実施例2の結果とも一致した。

【0076】

【表12】

siRNAを導入したヒト 大腸癌細胞株名	siRNA名	IC ₅₀ 値(μM)	有意差(p)
Ls174T	Control siRNA	0.86	0.047*
	TALDO siRNA	0.43	
HCT116	Control siRNA	1.53	0.0081**
	TALDO siRNA	0.73	
HT29	Control siRNA	16.14	0.0022***
	TALDO siRNA	2.77	

*: p < 0.05

**: p < 0.01

***: p < 0.005

【0077】

(d) C1QBP siRNA

結果を表13に示す。siRNA導入によりC1QBPをノックアウトしたHCT116は、Control siRNAと比較して、IC₅₀値が上昇し、オキサリプラチンに対する感受性が低下した。この結果は、C1QBPがオキサリプラチン高感受性株で発現量が多く、低感受性株で発現量が少ないことを示した実施例2の結果とも一致した。

【0078】

【表13】

siRNAを導入したヒト 大腸癌細胞株名	siRNA名	IC ₅₀ 値(μM)	有意差(p)
HCT116	Control siRNA	1.34	0.0060**
	C1QBP siRNA	2.18	

【0079】

(e) IPYR siRNA

結果を表14に示す。siRNA導入によりIPYRをノックアウトしたLs174Tは、Control siRNAと比較して、IC₅₀値が低下し、オキサリプラチンに対する感受性が亢進した。この結果は、IPYRがオキサリプラチン高感受性株で発現量が少なく、低感受性株で発現量が多いことを示した実施例2の結果とも一致した。

【0080】

10

20

30

40

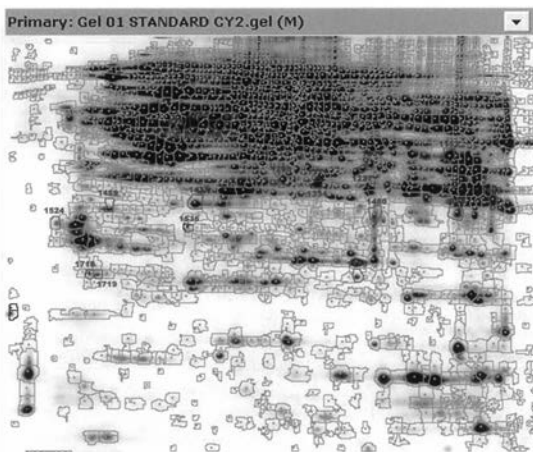
【表 1 4】

siRNAを導入したヒト 大腸癌細胞株名	siRNA名	IC ₅₀ 値 (μM)	有意差 (p)
L s 1 7 4 T	Control siRNA	0.68	0.0056**
	IPYR siRNA	0.39	

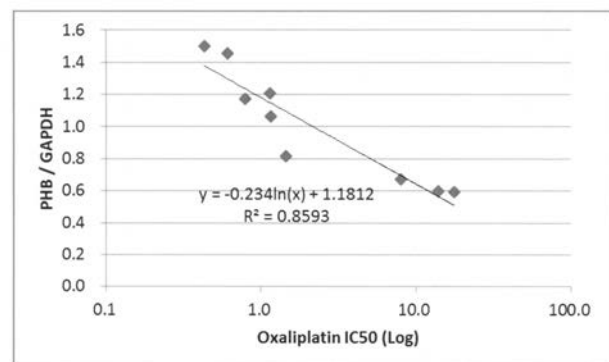
** : $p < 0.01$

10

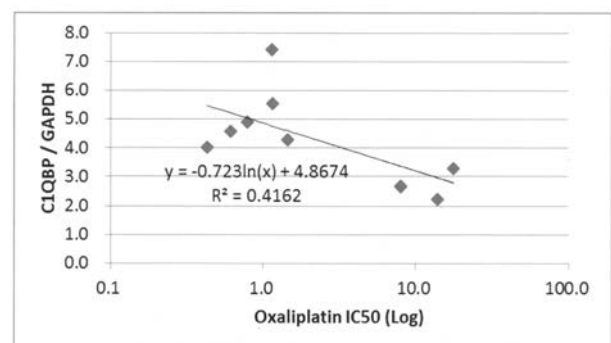
【図 1】



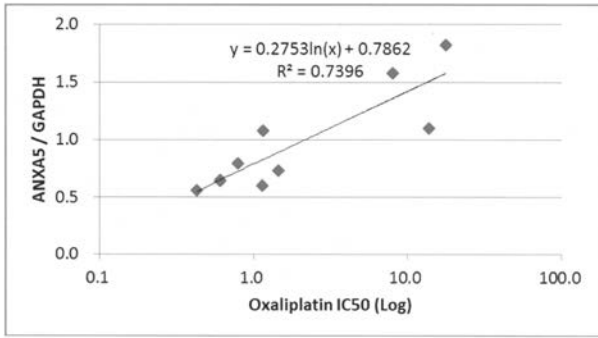
【図 2】



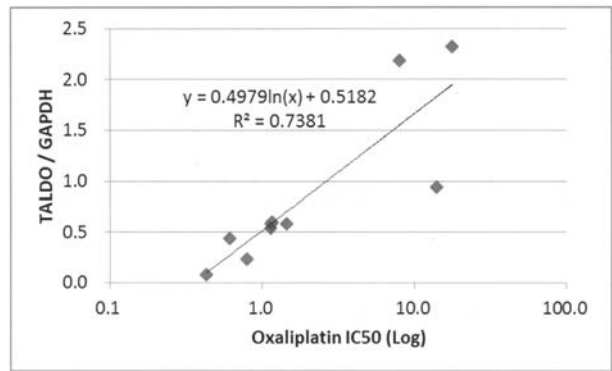
【図 3】



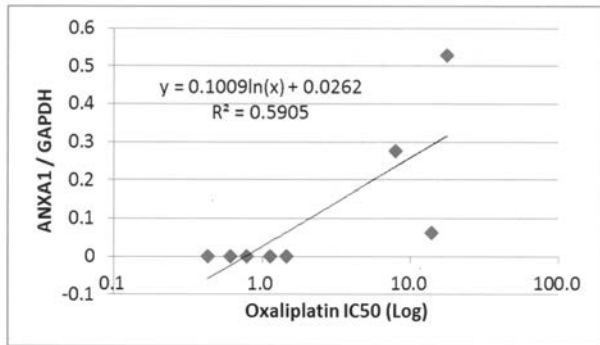
【 図 4 】



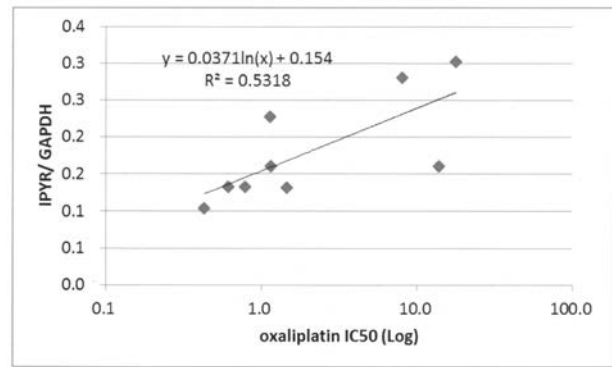
【 図 6 】



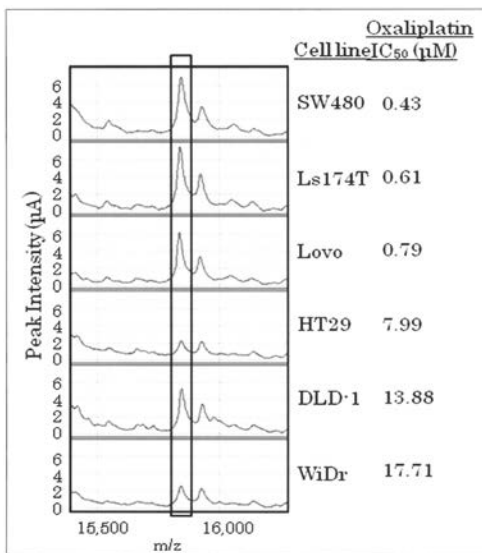
【 図 5 】



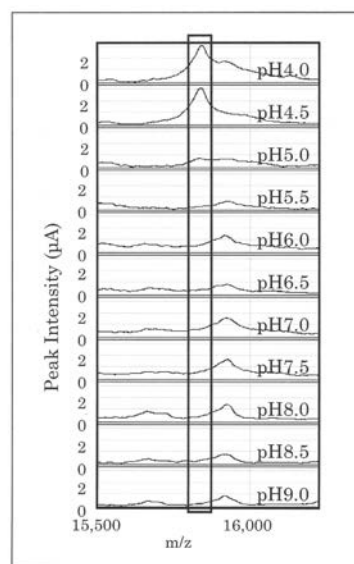
【 図 7 】



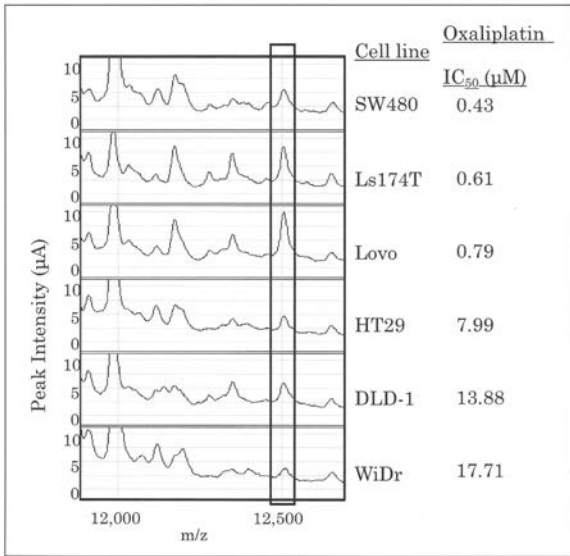
【 図 8 】



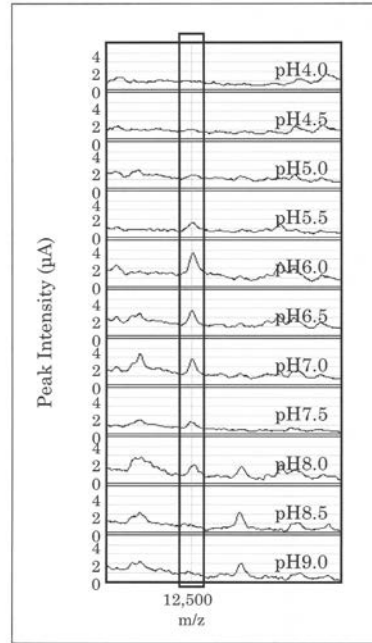
【 図 9 】



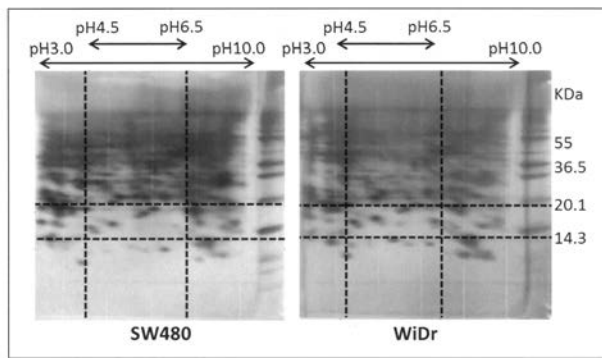
【 図 1 0 】



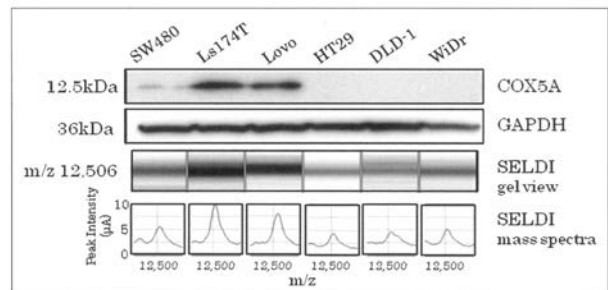
【 図 1 1 】



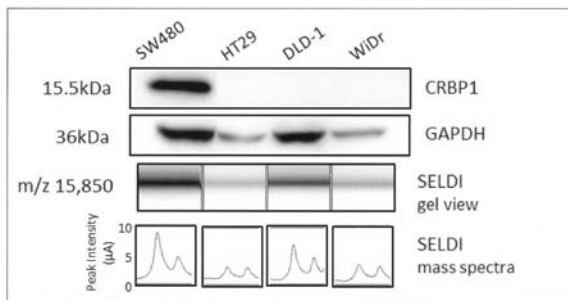
【 図 1 2 】



【 図 1 4 】



【 図 1 3 】



【配列表】

2019194597000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	(2006.01)		A 6 1 P 35/00			
A 6 1 P 43/00	(2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 2 1		
C 1 2 Q 1/68	(2018.01)		C 1 2 Q 1/68			
C 1 2 N 15/113	(2010.01)		C 1 2 N 15/113		Z	

(72)発明者 中村 美紀
東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内

(72)発明者 杉本 伸二
東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内

(72)発明者 高橋 寛行
東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内

Fターム(参考) 2G045 AA26 DA36
4B063 QA08 QA18 QQ08 QR35
4C084 AA19 AA20 MA66 NA05 NA14 ZB261 ZB262 ZC751 ZC752
4C206 AA01 AA02 JB16 MA02 MA04 MA86 NA05 NA14 ZB26 ZC75