

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5548695号
(P5548695)

(45) 発行日 平成26年7月16日(2014.7.16)

(24) 登録日 平成26年5月23日(2014.5.23)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/68	(2006.01)	GO 1 N 33/68	
GO 1 N 33/92	(2006.01)	GO 1 N 33/92	
GO 1 N 27/62	(2006.01)	GO 1 N 27/62	V
GO 1 N 33/50	(2006.01)	GO 1 N 33/50	Z
GO 1 N 33/15	(2006.01)	GO 1 N 33/15	Z

請求項の数 7 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2011-538508 (P2011-538508)	(73) 特許権者	899000079 学校法人慶應義塾 東京都港区三田2丁目15番45号
(86) (22) 出願日	平成22年10月29日(2010.10.29)	(73) 特許権者	000006884 株式会社ヤクルト本社 東京都港区東新橋1丁目1番19号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2010/069364	(74) 代理人	110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
(87) 国際公開番号	W02011/052750	(74) 代理人	100077562 弁理士 高野 登志雄
(87) 国際公開日	平成23年5月5日(2011.5.5)	(74) 代理人	100096736 弁理士 中嶋 俊夫
審査請求日	平成25年6月11日(2013.6.11)	(74) 代理人	100117156 弁理士 村田 正樹
(31) 優先権主張番号	特願2009-250258 (P2009-250258)		
(32) 優先日	平成21年10月30日(2009.10.30)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2010-175305 (P2010-175305)		
(32) 優先日	平成22年8月4日(2010.8.4)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗がん剤の感受性判定マーカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

質量分析計において、 $m/z = 149.05 \sim 149.06$ の陰イオンとして検出される分子、 $m/z = 152.99 \sim 153.00$ の陰イオンとして検出される分子、 $m/z = 724.34 \sim 724.35$ の陽イオンとして検出される分子、グリセロール3リン酸、ジヒドロピオブテリン、GABA、乳酸、アスパラギン、アスパラギン酸、2-メチルブチロイルカルニチン、1-メチルアデノシン及びグルタチオンから選ばれる1以上の分子からなる、イリノテカン、SN-38及びそれらの塩から選ばれる抗がん剤の大腸がん感受性判定マーカー。

【請求項2】

アスパラギン及びアスパラギン酸の比を測定するものである請求項1記載の抗がん剤の大腸がん感受性判定マーカー。

【請求項3】

イリノテカン、SN-38及びそれらの塩から選ばれる抗がん剤の大腸がん感受性を判定する目的で、検体中の、質量分析計において、 $m/z = 149.05 \sim 149.06$ の陰イオンとして検出される分子、 $m/z = 152.99 \sim 153.00$ の陰イオンとして検出される分子、 $m/z = 724.34 \sim 724.35$ の陽イオンとして検出される分子、グリセロール3リン酸、ジヒドロピオブテリン、GABA、乳酸、アスパラギン、アスパラギン酸、2-メチルブチロイルカルニチン、1-メチルアデノシン及びグルタチオンから選ばれる1以上の分子を測定する方法。

10

20

【請求項4】

検体が、大腸がんを有する被験者由来の生体試料である請求項3記載の測定方法。

【請求項5】

検体が、抗がん剤を投与された、大腸がんを有する被験者由来の生体試料である請求項3又は4記載の測定方法。

【請求項6】

検体中の、質量分析計において、 $m/z = 149.05 \sim 149.06$ の陰イオンとして検出される分子、 $m/z = 152.99 \sim 153.00$ の陰イオンとして検出される分子、 $m/z = 724.34 \sim 724.35$ の陽イオンとして検出される分子、グリセロール3リン酸、ジヒドロピオプテリン、GABA、乳酸、アスパラギン、アスパラギン酸、2-メチルブチロイルカルニチン、1-メチルアデノシン及びグルタチオンから選ばれる1以上の分子を測定するためのプロトコールを含むことを特徴とする請求項3～5のいずれか1項記載の測定方法を実施するためのキット。

10

【請求項7】

質量分析計において、 $m/z = 149.05 \sim 149.06$ の陰イオンとして検出される分子、 $m/z = 152.99 \sim 153.00$ の陰イオンとして検出される分子、 $m/z = 724.34 \sim 724.35$ の陽イオンとして検出される分子、グリセロール3リン酸、ジヒドロピオプテリン、GABA、乳酸、アスパラギン、アスパラギン酸、2-メチルブチロイルカルニチン、1-メチルアデノシン及びグルタチオンから選ばれる1以上の分子の発現変動を指標とするイリノテカン、SN-38及びそれらの塩から選ばれる抗がん剤の大腸がん感受性亢進剤のスクリーニング方法。

20

【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。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。

30

【0003】

塩酸イリノテカン(CPT-11)は日本で開発されたtopoisomerase I阻害という作用機序を有する抗がん剤である。日本において、CPT-11は、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、子宮頸癌、卵巣癌に有効な薬剤として1994年1月に認可され、さらに1995年7月に胃癌、結腸・直腸癌、乳癌、有棘細胞癌、悪性リンパ腫に対する適応が認められている。CPT-11は特に大腸癌の領域で多剤併用療法のfirst line drugあるいはsecond line drugとして世界的な標準治療薬の位置を占め、その有用性が認められている(非特許文献1～6)。

40

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CPT-11、オキサリプラチンなどのkey drugと、それまで大腸癌治療の中心的薬剤であったフルオロウラシル(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。しかしそれでもなお奏効率はおよそ50%程度であり、重篤な副作用という高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り、個々の治療反応性(レスポンス・ノンレスポンス)を判別する抗がん剤感受性予測マーカーの確立は急務である。

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

50

クールが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ある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。

【0004】

CPT-11はそれ自体抗腫瘍活性を有するものの、体内でCarboxylesteraseにより活性化され、CPT-11に比べおよそ100～数千倍強い抗腫瘍活性を有する7-ethyl-10-hydroxycamptothecin(SN-38)へと変換される。CPT-11とSN-38が同時に体内に存在することで抗腫瘍効果を呈すると考えられている。SN-38は肝細胞内でUDP-グルクロン酸転移酵素(UGT:UDP-glucuronosyltransferase)によりグルクロン酸抱合を受け、細胞毒性のないSN-38グルクロン酸抱合体(SN-38G)となり、おもに胆汁中に排泄され腸管へと移行し、その後は便中に排泄される。腸管に排泄されたSN-38Gの一部は、腸内細菌が有するβ-グルクロニダーゼにより脱抱合され再び活性型のSN-38となり、腸管上皮のトランスポーターを介し再吸収され腸肝循環、腸上皮細胞内でのUGTによるグルクロン酸抱合化などのステップを経ながら代謝・排泄を受ける(非特許文献7)。この際に、SN-38が腸管粘膜を障害し、下痢を誘発すると考えられている。また、細胞分裂の活発な骨髄にも影響をおよぼし、赤血球減少・白血球減少・血小板減少を引き起こすことが認められている。

重篤な下痢や好中球減少症などの副作用は、UGT1A1遺伝多型がもたらすSN-38体内曝露量の変化が一因であることが示されている。しかし治療効果に関しては、プロドラッグであるCPT-11から活性代謝物SN-38への変換とその解毒、さらに腸管循環の過程におけるSN-38の再生成や、CPT-11自体の代謝と代謝物からのSN-38の生成といった体内動態の複雑性により、また、抗腫瘍効果が腫瘍側の要因により規定されることが多いため、薬物動態により治療効果を予測できるとする報告は未だなされていない。末梢血単核球細胞のカルボキシルエステラーゼmRNA発現量がSN-38とSN-38GのAUC比とは相関するものの腫瘍縮小効果とは相関がなかったとする報告もなされている(非特許文献8)。

【0005】

CPT-11感受性もしくは耐性に関与する腫瘍側の因子としては、SN-38の標的であるtopoisomerase Iの変異の有無や発現量、CPT-11からSN-38への変換に関与するカルボキシルエステラーゼ活性(非特許文献9)、CPT-11やSN-38の細胞内蓄積量に影響するトランスポーター(multidrug resistance protein(MRP)-1、MRP-2、Breast cancer resistant protein(BCRP)/ABCG2)の関与が報告されており、その他、細胞増殖抗原Ki-67、がん抑制遺伝子p53などもCPT-11を用いた治療への反応性との関連が検討されている。ごく最近、in vitroにおいて抗がん剤感受性データとマイクロアレイのデータを組み合わせることで体系的に抗がん剤感受性を予測しようとする試みがなされており、カンプトテシン類ではトポテカンについて検討されている(非特許文献10)。臨床研究においては、抗アポトーシス作用をもつTissue inhibitor of metalloproteinase-1(TIMP-1)の血漿中レベルが、転移結腸・直腸癌に対するCPT-11+5-FU併用療法の臨床予後と有意に相関することが最近報告されている(非特許文献11)。このようにCPT-11感受性予測バイオマーカの必要性が認識され多くの研究がなされているが、標的であるtopoisomerase Iについても、5-FU感受性予測因子とされるチミジル酸合成酵素とともに5-FU+CPT-11併用療法の治療反応性との間に明確な関連性を見出せなかったとする報告もあるなど(非特許文献12)、治療反応性を予測し得る明確なバイオマーカは確立されていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】J Clin Oncol 1993; 11: 909 - 913 .

【非特許文献2】Semin Oncol 1999; 26 (1 Suppl 5) : 6 - 12 .

【非特許文献3】Lancet 1998; 352: 1407 - 1412 .

【非特許文献4】Pro ASCO 2005; Abstract #3506 .

【非特許文献5】N Engl J Med 2000; 343: 905 - 914 .

【非特許文献6】Lancet 2000; 355: 1041 - 1047 .

【非特許文献7】Cancer Res 1991; 51: 4187 - 4191 .

【非特許文献8】Clin Cancer Res 2005; 11: 6901 - 6907 .

【非特許文献9】Pharmacogenet Genomics 2007; 17: 1 - 10 .

【非特許文献10】Nat Med 2006; 12: 1294 - 1300 .

【非特許文献11】Clin Cancer Res 2007; 13: 4117 - 4122 .

【非特許文献12】Int J Cancer 2004; 111: 252 - 258 .

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、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】

【0008】

そこで本発明者らは、ヒトがん細胞株を培養し、SN - 38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、SN - 38低感受性細胞でSN - 38曝露後細胞内レベルの顕著な上昇が認められるピーク或いはSN - 38高感受性細胞でSN - 38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、質量分析計において、本体もしくはそのフラグメントが $m/z = 149.05 \sim 149.06$ の陰イオンとして検出される分子、 $m/z = 152.99 \sim 153.00$ の陰イオンとして検出される分子、 $m/z = 724.34 \sim 724.35$ の陽イオンとして検出される分子、グリセロール3リン酸、ジヒドロピオプテリン (Dihydrobiopterin; BH₂)、 γ -アミノ酪酸 (GABA)、乳酸、2 - メチルプテロイルカルニチンであることを見出した。また、SN - 38高感受性細胞或いはSN - 38低感受性細胞でSN - 38曝露後コントロール群と異なる細胞内レベルの変動をアスパラギン、アスパラギン酸が示すことを見出し、SN - 38曝露時のアスパラギンの対アスパラギン酸比をSN - 38非曝露時のアスパラギンの対アスパラギン酸比で除することによって算出される値が抗がん剤の感受性判定マーカーとなることを見出した。さらにまた、本発明者らは、8種類のヒトがん細胞株を培養し、それらの細胞内代謝物についてCE - TOFMSを用いて抗がん剤感受性判定マーカーの探索を行ったところ、抗がん剤に対する感受性の低下に伴い細胞内レベルが上昇する代謝物を見出し、その代謝物がGABA、1 - メチルアデノシン、グルタチオン (GSH) が関与する代謝系上の物質であることを見出した。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や上記代謝物濃度の比を指標とすれば、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、上記代謝物濃度の比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。

10

20

30

40

50

【0009】

すなわち、本発明は、質量分析計において、本体もしくはそのフラグメントが $m/z = 149.05 \sim 149.06$ の陰イオンとして検出される分子（以下、代謝物Aという）、 $m/z = 152.99 \sim 153.00$ の陰イオンとして検出される分子（以下、代謝物Bという）、 $m/z = 724.34 \sim 724.35$ の陽イオンとして検出される分子（以下、代謝物Dという）、グリセロール3リン酸、ジヒドロピオプテリン、GABA、乳酸、アスパラギン、アスパラギン酸、2-メチルブチロイルカルニチン、1-メチルアデノシン、グルタチオン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抗がん剤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抗がん剤感受性の判定方法を提供するものである。

また、本発明は、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抗がん剤感受性の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抗がん剤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抗がん剤感受性亢進剤を提供するものである。

さらに本発明は、上記の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るがん治療用組成物を提供するものである。

さらに本発明は、抗がん剤感受性を判定するための上記の物質を提供するものである。

【発明の効果】

【0010】

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】

【0011】

【図1】 50 nmol/L SN-38曝露時におけるHT-29、HCT-116細胞の平均生存率の経時的変化を示す図である。

【図2】HT-29、HCT-116におけるSN-38曝露後の代謝物Aの細胞内レベルの経時的変化を示す図である。

【図3】HT-29、HCT-116におけるSN-38曝露後の代謝物Bの細胞内レベルの経時的変化を示す図である。

【図4】HT-29、HCT-116におけるSN-38曝露後の2-メチルブチロイルカルニチンの細胞内レベルの経時的変化を示す図である。

【図5】HT-29、HCT-116におけるSN-38曝露後の BH_2 の細胞内レベルの経時的変化を示す図である。

【図6】HT-29、HCT-116におけるSN-38曝露後の代謝物Dの細胞内レベルの経時的変化を示す図である。

【図7】HT-29、HCT-116におけるSN-38曝露後のグリセロール3リン酸の細胞内レベルの経時的変化を示す図である。

【図8】HT-29、HCT-116におけるSN-38曝露後のGABAの細胞内レベルの経時的変化を示す図である。

【図9】HT-29、HCT-116におけるSN-38曝露後の乳酸の細胞内レベルの経時的変化を示す図である。

【図10】HT - 29、HCT - 116におけるSN - 38曝露後のアスパラギンの細胞内レベルの経時的変化を示す図である。

【図11】HT - 29、HCT - 116におけるSN - 38曝露後のアスパラギン酸の細胞内レベルの経時的変化を示す図である。

【図12】HT - 29、HCT - 116におけるSN - 38曝露時のアスパラギンの対アスパラギン酸比をSN - 38非曝露時のアスパラギンの対アスパラギン酸比で除することによって算出される値（ $[\text{アスパラギン} / \text{アスパラギン酸}]_{\text{SN-38}} / [\text{アスパラギン} / \text{アスパラギン酸}]_{\text{Control}}$ ）の経時的変化を示す図である。

【図13】定常状態におけるGABAの細胞内レベルと各がん細胞株におけるSN - 38感受性との関係を示す図である。

10

【図14】8種類のヒト大腸癌細胞株のSN - 38に対する感受性を示す図である。

【図15】定常状態における1 - メチルアデノシン、GABA、ヒポタウリン、グルタチオン、1 - メチルニコチンアミドの細胞内レベルと各がん細胞株におけるSN - 38感受性との関係を示す図である。

【図16】定常状態におけるグルタチオン代謝系上の物質の細胞内レベルと各がん細胞株におけるSN - 38感受性との関係を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明における抗がん剤感受性判定マーカーは、代謝物A、B、D、グリセロール3リン酸、ジヒドロピオプテリン、GABA、乳酸、アスパラギン、アスパラギン酸、2 - メチルブチロイルカルニチン、1 - メチルアデノシン、グルタチオン、及びこれらの分子が関与する代謝系上の物質から選ばれる分子（以下、「代謝系物質」ということもある。）である。このうち、代謝物A、B、Dとしては、キャピラリー電気泳動 - 飛行時間型質量分析計（CE - TOFMS）において、本体もしくはそのフラグメントが $m/z = 149.05 \sim 149.06$ の陰イオンとして検出される分子、本体もしくはそのフラグメントが $m/z = 152.99 \sim 153.00$ の陰イオンとして検出される分子、本体もしくはそのフラグメントが $m/z = 724.34 \sim 724.35$ の陽イオンとして検出される分子である。また、これらの分子の濃度を変動させる代謝系上のすべての物質が含まれ、当該物質としては、これらの分子への代謝を亢進する物質、阻害する物質、これらの分子からの代謝を促進する物質、阻害する物質などが挙げられる。

20

30

【0013】

本発明における抗がん剤感受性判定マーカーの一つは、グリセロール3リン酸又はこれが関与する代謝系上の物質（グリセロール3リン酸代謝系物質ともいう）であり、当該物質としてはグリセロール3リン酸の他、代謝系においてグリセロール3リン酸の濃度を変動させるすべての物質が含まれ、グリセロール3リン酸への代謝を亢進する物質、阻害する物質、グリセロール3リン酸からの代謝を促進する物質、阻害する物質などが挙げられる。これらのうち、グリセロール3リン酸が特に好ましい。

【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、ジヒドロピオプテリン（ BH_2 ）又はこれが関与する代謝系上の物質（ BH_2 代謝系物質ともいう）であり、当該物質としては BH_2 の他、代謝系において BH_2 の濃度を変動させるすべての物質が含まれ、 BH_2 への代謝を亢進する物質、阻害する物質、 BH_2 からの代謝を促進する物質、阻害する物質などが挙げられる。これらのうち、 BH_2 が特に好ましい。

40

【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、GABA又はこれが関与する代謝系上の物質（GABA代謝系物質ともいう）であり、当該物質としてはGABAの他、代謝系においてGABAの濃度を変動させるすべての物質が含まれ、GABAへの代謝を亢進する物質、阻害する物質、GABAからの代謝を促進する物質、阻害する物質などが挙げられる。これらのうち、GABAが特に好ましい。

【0016】

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、乳酸又はこれが関与する代謝系上の物質（乳酸代謝系物質ともいう）であり、当該物質としては乳酸の他、代謝系において乳酸の濃度を変動させるすべての物質が含まれ、乳酸への代謝を亢進する物質、阻害する物質、乳酸からの代謝を促進する物質、阻害する物質などが挙げられる。これらのうち、乳酸が特に好ましい。

【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、アスパラギン、アスパラギン酸又はこれらが関与する代謝系上の物質である。アスパラギン及びアスパラギン酸の場合にはこれらの比が重要であり、具体的にはアスパラギンとアスパラギン酸の濃度から算出されるアスパラギンの対アスパラギン酸比、より具体的には抗がん剤曝露時のアスパラギンの対アスパラギン酸比を抗がん剤非曝露時のアスパラギンの対アスパラギン酸比で除することによって算出される値

10

【0018】

【数1】

$$\left(\frac{[\text{アスパラギン}/\text{アスパラギン酸}]_{\text{抗がん剤}}}{[\text{アスパラギン}/\text{アスパラギン酸}]_{\text{Control}}} \right)$$

【0019】

が挙げられる。当該比の算出に使用される物質としてはアスパラギン、アスパラギン酸の他、アスパラギン、アスパラギン酸が関与する代謝系上の物質（アスパラギン代謝系物質、アスパラギン酸代謝系物質ともいう）を使用することができ、代謝系においてアスパラギン、アスパラギン酸の濃度を変動させるすべての物質が含まれ、アスパラギン、アスパラギン酸への代謝を亢進する物質、阻害する物質、アスパラギン、アスパラギン酸からの代謝を促進する物質、阻害する物質などが挙げられる。これらのうち、アスパラギン、アスパラギン酸が特に好ましい。

20

【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、2-メチルブチロイルカルニチン又はこれが関与する代謝系上の物質（2-メチルブチロイルカルニチン代謝系物質ともいう）であり、当該物質としては2-メチルブチロイルカルニチンの他、代謝系において2-メチルブチロイルカルニチンの濃度を変動させるすべての物質が含まれ、2-メチルブチロイルカルニチンへの代謝を亢進する物質、阻害する物質、2-メチルブチロイルカルニチンからの代謝を促進する物質、阻害する物質などが挙げられる。これらのうち、2-メチルブチロイルカルニチンが特に好ましい。

30

【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、1-メチルアデノシン又はこれが関与する代謝系上の物質（1-メチルアデノシン代謝系物質ともいう）であり、当該物質としては1-メチルアデノシンの他、代謝系において1-メチルアデノシンの濃度を変動させるすべての物質が含まれ、1-メチルアデノシンへの代謝を亢進する物質、阻害する物質、1-メチルアデノシンからの代謝を促進する物質、阻害する物質などが挙げられる。これらのうち、1-メチルアデノシンが特に好ましい。

【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、グルタチオン又はこれが関与する代謝系上の物質（グルタチオン代謝系物質ともいう）であり、当該物質としてはグルタチオンの他、代謝系においてグルタチオンの濃度を変動させるすべての物質が含まれ、グルタチオンへの代謝を亢進する物質、阻害する物質、グルタチオンからの代謝を促進する物質、阻害する物質などが挙げられる。これらのうち、グルタチオン、ヒポタウリン、1-メチルニコチンアミド、タウリン、グルタチオンジスルフィド（GSSG）、S-アデノシルホモシステイン、ニコチンアミド、 γ -グルタミルシステイン（ γ -Glu-Cys）、スペルミンが好ましく、特にグルタチオン、ヒポタウリン、1-メチルニコチンアミドが好ましい。

40

【0023】

50

代謝物 A、B、2-メチルブチロイルカルニチンは、後記実施例に示すように、SN-38 曝露後、SN-38 低感受性である HT-29 で細胞内レベルの顕著な上昇が認められた。一方、SN-38 高感受性である HCT-116 では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、特に CPT-11、SN-38 等の抗がん剤感受性判定マーカーとして有用である。

【0024】

代謝物 D、グリセロール3リン酸、BH₂、乳酸は、後記実施例に示すように、SN-38 曝露後、SN-38 高感受性である HCT-116 で細胞内レベルの顕著な上昇が認められた。一方、SN-38 低感受性である HT-29 では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、特に CPT-11、SN-38 等の抗がん剤感受性判定マーカーとして有用である。

【0025】

GABA は、後記実施例に示すように、SN-38 曝露後、SN-38 低感受性である HT-29 で細胞内レベルの顕著な上昇が認められた。一方、SN-38 高感受性である HCT-116 では細胞内レベルの顕著な変動は認められなかった。また、もともとの代謝物レベルとして、SN-38 低感受性である HT-29 で細胞内レベルが高く、SN-38 高感受性である HCT-116 で細胞内レベルが低かった。さらに、8種類のヒトがん細胞株を用いて検討したところ、SN-38 に対する感受性の低下に伴い細胞内 GABA レベルが上昇した。従って、GABA は、特に CPT-11、SN-38 等の抗がん剤感受性判定マーカーとして有用である。

【0026】

アスパラギンは、後記実施例に示すように、SN-38 高感受性である HCT-116 で SN-38 曝露後コントロール群と異なる細胞内レベルの変動を示したが、SN-38 低感受性である HT-29 では SN-38 曝露群とコントロール群で細胞内レベルに差は認められなかった。また、アスパラギン酸は、後記実施例に示すように、SN-38 低感受性である HT-29 で SN-38 曝露後コントロール群と異なる細胞内レベルの変動を示したが、SN-38 高感受性である HCT-116 では SN-38 曝露群とコントロール群で細胞内レベルに差は認められなかった。SN-38 曝露時のアスパラギンの対アスパラギン酸比を SN-38 非曝露時のアスパラギンの対アスパラギン酸比で除することによって算出される値 ($[\text{アスパラギン} / \text{アスパラギン酸}]_{\text{SN-38}} / [\text{アスパラギン} / \text{アスパラギン酸}]_{\text{Control}}$) は、SN-38 高感受性である HCT-116 で顕著な上昇が認められ、一方で SN-38 低感受性である HT-29 では顕著な減少が認められた。従って、当該アスパラギンとアスパラギン酸濃度の比は、特に CPT-11、SN-38 等の抗がん剤感受性判定マーカーとして有用である。

【0027】

1-メチルアデノシン、グルタチオン代謝系物質は、後記実施例に示すように、8種類のヒトがん細胞株を用いて検討したところ、SN-38 に対する感受性の低下に伴い細胞内のこれらの物質のレベルが上昇した。従って、1-メチルアデノシン、グルタチオン代謝系物質は、特に CPT-11、SN-38 等の抗がん剤感受性判定マーカーとして有用である。

【0028】

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 CPT-11、SN-38、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 (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 (peme

10

20

30

40

50

trexed)、フルオロウラシル (fluorouracil)、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)、ドキシルピシン (doxorubicin)、エピルピシン (epirubicin)、ダウノルピシン (daunorubicin)、イダルピシン (idarubicin)、ピラルピシン (pirarubicin)、ミトキサントロン (mitoxantrone)、アムルピシン (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)、アクラルピシン (acclarubicin)、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)、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、このうち植物アルカロイド系抗がん剤、例えばCPT-11、SN-38又はそれらの塩が好ましい。

【0029】

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。

【0030】

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、特に非小細胞肺癌、小細胞肺癌、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。

【0031】

10

20

30

40

50

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。

【0032】

代謝物A、B、2-メチルブチロイルカルニチンについて、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ければそのがんは抗がん剤感受性であると判定できる。

10

また、抗がん剤投与後初期の段階において、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。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。

【0033】

代謝物D、グリセロール3リン酸、BH₂、乳酸について、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ければそのがんは抗がん剤感受性ではないと判定できる。

20

また、抗がん剤投与後初期の段階において、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がないと判定できる。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。

30

【0034】

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ければそのがんは抗がん剤感受性であると判定できる。

また、抗がん剤投与前あるいは投与後初期の段階において、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。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。

40

【0035】

アスパラギン、アスパラギン酸の濃度の比について、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アスパラギンとアスパラギン酸の濃度を測定し、抗がん剤投与前に比べて投与後におけるアスパラギンの対アスパラギン酸比が上昇す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いてアスパラギンの対アスパラギン酸比が減少すればそのがんは抗がん剤感受性ではないと判定できる。

50

また、抗がん剤投与後初期の段階において、アスパラギンの対アスパラギン酸比が所定の基準より低いと判断される数値を有する場合は、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。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。

【 0 0 3 6 】

1 - メチルアデノシン、グルタチオン代謝系物質について、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。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。

【 0 0 3 7 】

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。

【 0 0 3 8 】

抗がん剤曝露後における代謝物 A、B、2 - メチルブチロイルカルニチン、GABA、1 - メチルアデノシン、グルタチオン代謝系物質の発現変動、具体的には変動の抑制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* において代謝物 A、B、2 - メチルブチロイルカルニチン、GABA、1 - メチルアデノシン、グルタチオン代謝系物質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抑制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、細胞内における代謝物 A、B、2 - メチルブチロイルカルニチン、GABA、1 - メチルアデノシン、グルタチオン代謝系物質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代謝物 A、B、2 - メチルブチロイルカルニチン、GABA、1 - メチルアデノシン、グルタチオン代謝系物質の変動を抑制する物質は、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前の代謝物 A、B、2 - メチルブチロイルカルニチン、GABA、1 - メチルアデノシン、グルタチオン代謝系物質の濃度を低下させる物質、抗がん剤曝露後の代謝物 A、B、2 - メチルブチロイルカルニチン、GABA、1 - メチルアデノシン、グルタチオン代謝系物質の変動を抑制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。

【 0 0 3 9 】

また、抗がん剤曝露後における代謝物 D、グリセロール 3 リン酸、 BH_2 、乳酸の発現変動、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* において代謝物 D、グリセロール 3 リン酸、 BH_2 、乳酸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

、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代謝物D、グリセロール3リン酸、 BH_2 、乳酸の変動を促進する物質は、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代謝物D、グリセロール3リン酸、 BH_2 、乳酸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。

【0040】

また、抗がん剤曝露後におけるアスパラギンの対アスパラギン酸比の変動、具体的には比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、抗がん剤曝露後におけるアスパラギンとアスパラギン酸濃度の比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、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アスパラギンとアスパラギン酸濃度の比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アスパラギンとアスパラギン酸濃度の比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。なお、これらの濃度の比として、抗がん剤曝露時のアスパラギンの対アスパラギン酸比を抗がん剤非曝露時のアスパラギンの対アスパラギン酸比で除することによって算出される値を用いてもよく、この値を用いた場合、感度よく鋭敏に抗がん剤感受性亢進剤をスクリーニングすることができる。

【0041】

また、代謝物A、B、2-メチルブチロイルカルニチン、GABA、1-メチルアデノシン、グルタチオン代謝系物質を指標とすれば、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、ある物質によりこれら代謝系物質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、曝露前に比べて代謝物A、B、2-メチルブチロイルカルニチン、GABA、1-メチルアデノシン、グルタチオン代謝系物質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、これら代謝系物質の濃度が変動すれば、その物質は抗がん剤である。薬効が期待できる抗がん剤であれば、これら代謝系物質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、これら代謝系物質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。

【0042】

また、代謝物D、グリセロール3リン酸、 BH_2 、乳酸を指標とすれば、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、ある物質によりこれら代謝系物質の濃度が上昇すれば、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、曝露前に比べて代謝物D、グリセロール3リン酸、 BH_2 、乳酸代謝系物質の濃度が上昇すれば、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、これら代謝系物質の濃度が上昇すれば、その物質は抗がん剤である。薬効が期待できる抗がん剤であれば、これら代謝系物質の濃度上昇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、これら代謝系物質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。

【0043】

また、アスパラギンの対アスパラギン酸比を指標とすれば、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、ある物質によりアスパラギンとアスパラギン酸濃度の比が上昇すれば、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、曝露前に比べてアスパラギ

ンとアスパラギン酸濃度の比が上昇すれば、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、アスパラギンとアスパラギン酸濃度の比が上昇すれば、その物質は抗がん剤である。薬効が期待できる抗がん剤であれば、アスパラギンとアスパラギン酸濃度の比の上昇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、アスパラギンとアスパラギン酸濃度の比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。

なお、アスパラギンとアスパラギン酸濃度の比として、被検査物質曝露時のアスパラギンの対アスパラギン酸比を被検査物質非曝露時のアスパラギンの対アスパラギン酸比で除することによって算出される値を用いてもよく、この値を用いた場合、感度よく鋭敏に抗がん剤をスクリーニングすることができる。

【 0 0 4 4 】

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、CPT - 11、SN - 38、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 (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 (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)、クラドリピン (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 (amrubicin)、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 (mitomycin 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)、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 (

10

20

30

40

50

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、植物アルカロイド系抗がん剤、例えばCPT-11、SN-38又はそれらの塩が特に好ましい。

【実施例】

【0045】

次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明する。

【0046】

実施例 1

(1) 方法

(a) 使用細胞

2種類のヒト大腸癌細胞株(HCT-116、HT-29)を用いた。これらの細胞は株式会社ヤクルト本社より入手した。

培養は、100mm/Tissue Culture Dish(IWAKI)にて、培地(Doulbecco's modified Eagle's Medium、10% Fetal Bovine Serum)、37、5%CO₂の条件下にて行った。

(b) 薬剤

SN-38原末は、株式会社ヤクルト本社より入手した。SN-38はDMSOに溶解し、各実験で培地中のDMSOの濃度が0.1%以下となるように希釈して使用した。

【0047】

(c) SN-38に対する感受性の評価

両細胞について、50nmol/LのSN-38に24、48、72時間曝露後の細胞生存率をMTS assay(Cell Titer 96TM AQueous One Solution Cell Proliferation Assay、Promega)にて評価した。感受性の評価は異なる継代数の細胞にてtriplicateで3回行い、その平均値と標準偏差を算出した。

【0048】

(d) SN-38の曝露と細胞内代謝物の採取

両細胞に対して、50nmol/LのSN-38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(SN-38のみを除いた培地を用いたものをコントロール群とした)。0hr、3hr、8hr、24hr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。

【0049】

(e) 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。

【0050】

(f) 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

10

20

30

40

50

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、 $m/z = 50 \sim 1000$ の代謝物を一斉に定量分析した。

【0051】

(2) 結果

MTS assayにより 50 nmol/L のSN-38曝露後の経時的な細胞生存率について検討したところ、各細胞の生存率は24hr曝露後においてはほとんど差が認められなかった。しかし、曝露時間が長くなるにつれて各細胞の生存率は低下し、その差は経時的に拡大した。72hr曝露後における細胞生存率はHT-29で約85%、HCT-116で約35%となり、HT-29がHCT-116に比べSN-38低感受性であることが確認された(図1)。

10

【0052】

CE-TOFMSを用いた網羅的メタボローム解析手法により、SN-38曝露に伴う細胞内メタボローム変動を網羅的に解析した。両細胞について、SN-38に24時間曝露した群とコントロール群を比較し、両群で差の大きいピークを抽出した。それらのピークについてSN-38曝露後の経時的変動をグラフ化し、特徴的な変動を示す以下の代謝物を見出した(図2~7、9~11)。

(1) SN-38曝露後、HT-29で細胞内レベルの顕著な上昇が認められた代謝物・ $m/z = 149.05 \sim 149.06$ (陰イオン)
 ・ $m/z = 152.99 \sim 153.00$ (陰イオン)
 ・ $m/z = 246.16 \sim 246.17$ (陽イオン)

20

(2) SN-38曝露後、HCT-116で細胞内レベルの顕著な上昇が認められた代謝物

$m/z = 171.00$ (陰イオン)
 $m/z = 240.10 \sim 240.11$ (陽イオン)
 $m/z = 724.34 \sim 724.35$ (陽イオン)
 $m/z = 89.02$ (陰イオン)

(3) HCT116でSN-38曝露後コントロール群と異なる細胞内レベルの変動を示すピーク

$m/z = 133.06$ (陽イオン)

(4) HT-29でSN-38曝露後コントロール群と異なる細胞内レベルの変動を示すピーク

30

$m/z = 134.04$ (陽イオン)

【0053】

$m/z = 171.00$ のピークに関して、解析ソフトAnalyst™ QS (Applied Biosystems, Inc.)を用いて、組成の推定を進めた。親ピークに対するアイソトープの割合、精密質量等の情報から組成を特定した結果、候補ピークとした $m/z = 171.00$ のイオン組成は $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_6\text{P}$ であった。京都大学が作製したKEGG:生命システム情報統合データベース(<http://www.kegg.jp/>)の代謝データベースを用いて、このイオン組成から推定される物質を検索したところ、このピークがグリセロール3リン酸であることが判明した。グリセロール3リン酸標品を用いた検討により、キャピラリー電気泳動の移動時間の一致も確認された。

40

【0054】

$m/z = 149.05 \sim 149.06$ (陰イオン)のピークに関して、Capillary electrophoresis-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (CE-QTOFMS)を用いて組成の推定を進めた。その結果、 $m/z = 149.05 \sim 149.06$ のイオン組成は $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_5$ と考えられた。

また、 $m/z = 152.99 \sim 153.00$ (陰イオン)のピークに関して、CE-QTOFMSを用いて組成の推定を進めた。その結果、 $m/z = 152.99 \sim 153.00$ のイオン組成は $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_5\text{P}$ と考えられた。

50

また、 $m/z = 246.16 \sim 246.17$ (陽イオン) のピークに関して、CE-QTOFMSを用いて組成の推定を進めた。その結果、 $m/z = 246.16 \sim 246.17$ のイオン組成は $C_{12}H_{24}NO_4$ であった。Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca/>)を用いて、このイオン組成から推定される物質を検索したところ、このピークが2-メチルブチロイルカルニチンであることが判明した。2-メチルブチロイルカルニチン標品を用いた検討により、キャピラリー電気泳動の移動時間の一致も確認された。

また、 $m/z = 240.10 \sim 240.11$ (陽イオン) のピークに関して、CE-QTOFMSを用いて組成の推定を進めた。その結果、 $m/z = 240.10 \sim 240.11$ のイオン組成は $C_9H_{14}N_5O_3$ であった。Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca/>)を用いて、このイオン組成から推定される物質を検索したところ、このピークがジヒドロピオプテリンであることが判明した。ジヒドロピオプテリン標品を用いた検討により、キャピラリー電気泳動の移動時間の一致も確認された。

【0055】

$m/z = 89.02$ のピークに関して、解析ソフトAnalyst™ QS (Applied Biosystems, Inc.)を用いて、組成の推定を進めた。親ピークに対するアイソトープの割合、精密質量等の情報から組成を特定した結果、候補ピークとした $m/z = 89.02$ のイオン組成は $C_3H_5O_3$ であった。京都大学が作製したKEGG:生命システム情報統合データベース (<http://www.kegg.jp/>)の代謝データベースを用いて、このイオン組成から推定される物質を検索したところ、このピークが乳酸であることが判明した。乳酸標品を用いた検討により、キャピラリー電気泳動の移動時間の一致も確認された。

【0056】

また、コントロール群について両細胞を比較し、差の大きいピークを抽出した。そのうち、 $m/z = 104.070$ のピークについて、SN-38低感受性であるHT-29で細胞内レベルが高く、SN-38高感受性であるHCT-116で細胞内レベルが低かった。また、SN-38曝露後の経時的変動をグラフ化したところ、特徴的な変動を示したことから、SN-38感受性と関連する代謝物と考えられた(図8)。このピークに関して、解析ソフトAnalyst™ QS (Applied Biosystems, Inc.)を用いて、組成の推定を進めた。親ピークに対するアイソトープの割合、精密質量等の情報から組成を特定した結果、候補ピークとした $m/z = 104.070$ のイオン組成は $C_4H_{10}NO_2$ であった。京都大学が作製したKEGG:生命システム情報統合データベース (<http://www.kegg.jp/>)の代謝データベースを用いて、このイオン組成から推定される物質を検索したところ、このピークが γ -aminobutyric acid (GABA) であることが判明した。GABA標品を用いた検討により、キャピラリー電気泳動の移動時間の一致も確認された。

【0057】

$m/z = 133.06$ のピークに関して、解析ソフトAnalyst™ QS (Applied Biosystems, Inc.)を用いて、組成の推定を進めた。親ピークに対するアイソトープの割合、精密質量等の情報から組成を特定した結果、候補ピークとした $m/z = 133.06$ のイオン組成は $C_4H_9N_2O_3$ であった。京都大学が作製したKEGG:生命システム情報統合データベース (<http://www.kegg.jp/>)の代謝データベースを用いて、このイオン組成から推定される物質を検索したところ、このピークがアスパラギンであることが判明した。アスパラギン標品を用いた検討により、キャピラリー電気泳動の移動時間の一致も確認された。

また、 $m/z = 134.04$ のピークに関して、解析ソフトAnalyst™ QS (Applied Biosystems, Inc.)を用いて、組成の推定を進めた。親ピークに対するアイソトープの割合、精密質量等の情報から組成を特定した結果、候補ピークとした $m/z = 134.04$ のイオン組成は $C_4H_8NO_4$ であった。京都大学が作

10

20

30

40

50

製したKEGG：生命システム情報統合データベース (<http://www.kegg.jp/>) の代謝データベースを用いて、このイオン組成から推定される物質を検索したところ、このピークがアスパラギン酸であることが判明した。アスパラギン酸標品を用いた検討により、キャピラリー電気泳動の移動時間の一致も確認された。

【0058】

さらに、アスパラギンの対アスパラギン酸比（[アスパラギン/アスパラギン酸]）を算出し、SN-38曝露時の[アスパラギン/アスパラギン酸]をSN-38非曝露時の[アスパラギン/アスパラギン酸]で除した（[アスパラギン/アスパラギン酸]_{SN-38} / [アスパラギン/アスパラギン酸]_{Control}）。その結果、SN-38高感受性であるHCT-116では上記の値に顕著な上昇が認められた。一方、SN-38低感受性であるHT-29では上記の値に顕著な減少が認められた（図12）。

10

【0059】

実施例2

(1) 方法

(a) 使用細胞

8種類のヒト大腸癌細胞株（HCT-116、HT-29、HCT-15、Lovo、LS174T、SW480、SW620、WiDr）を用いた。HCT-116、HT-29は株式会社ヤクルト本社より、Lovo、SW480、WiDrは大日本住友製薬株式会社より、HCT-15、LS174Tは東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより、SW620は住商ファーマインターナショナル株式会社より入手した。

20

(b) 薬剤

SN-38原末は、株式会社ヤクルト本社より入手した。SN-38はDMSOに溶解し、各実験で培地中のDMSOの濃度が0.1%以下となるように希釈して使用した。

【0060】

(c) SN-38に対する感受性の評価

各細胞について、0nmol/L~5μmol/LのSN-38に72時間曝露後の細胞生存率をMTS assay (CellTiter 96™ Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) にて評価し、IC₅₀値（SN-38未処理wellに対して細胞数を50%抑制する濃度）を算出して各細胞におけるSN-38感受性とした。実験はtriplicateで2回行った。

30

【0061】

(d) 細胞内代謝物の採取

定常状態における各細胞に対して、培地を除去し氷上にて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。実験はtriplicateで2回行った。

【0062】

(e) 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。

40

【0063】

(f) 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、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 = 5

50

0 ~ 1000 の代謝物を一斉に定量分析した。

【0064】

(g) GABA と SN-38 感受性との相関分析

各細胞サンプルから CE-TOFMS により検出された GABA を示すピークについて、ピークエリアと各細胞の IC₅₀ 値 (50% 細胞増殖抑制濃度) の関係について相関分析を行った。

【0065】

(2) 結果

(a) 8 種類のヒト大腸癌細胞株における SN-38 感受性の評価

各細胞における IC₅₀ 値は $0.74 \pm 0.23 \sim 68.94 \pm 6.83 \text{ nmol/L}$ であり、その感受性には大きな幅が認められた (図 13)。

(b) GABA と SN-38 感受性との相関分析

CE-TOFMS により検出された GABA を示すピークについて、ピークエリアと各細胞の IC₅₀ 値の関係について相関分析を行ったところ、高い正の相関が認められた (図 13)。

【0066】

実施例 3

(1) 方法

実施例 2 と同様の実験をもう一度ずつ繰り返し、それぞれ合計 3 回の実験から得られたデータについて、さらに詳細な解析を進めた。各細胞サンプルから CE-TOFMS により検出されたピークについて、既に m/z 及び移動時間が明らかとなっている 278 の標品データとの照合により、いずれかの細胞で検出が確認された 146 の代謝物を同定した。この 146 の代謝物について、8 種類のヒト大腸癌細胞における細胞内量とそれぞれの細胞の $\text{Log} [\text{IC}_{50}]$ との関係性を単回帰分析により検討した。

【0067】

(2) 結果

(a) 8 種類のヒト大腸癌細胞株における SN-38 感受性の評価

8 種類のヒト大腸癌細胞株 (HCT-116、HT-29、HCT-15、Lovo、LS174T、SW480、SW620、WidR) における感受性は MTS assay によって算出される IC₅₀ を指標として評価した。その結果、WidR の IC₅₀ ($63.27 \pm 10.95 \text{ nM}$) が最も高く、SN-38 低感受性を示した。一方、LS174T の IC₅₀ ($0.71 \pm 0.18 \text{ nM}$) が最も低く、SN-38 高感受性を示した (図 14)。

【0068】

(b) 細胞内代謝物量と SN-38 感受性との関係

8 種類のヒト大腸癌細胞から細胞内代謝物を抽出し、CE-TOFMS にて一斉分析した。得られたデータについて、当研究室で所有する 278 の標品データと照合し、いずれかの細胞で検出が確認され、同定できた 146 の代謝物について、8 種類のヒト大腸癌細胞における細胞内量とそれぞれの細胞の $\text{Log} [\text{IC}_{50}]$ との関係性を単回帰分析により検討した。その結果、細胞内量と $\text{Log} [\text{IC}_{50}]$ との間に有意な関連が認められた代謝物として ($p < 0.01$ 、 $R^2 = 0.7$)、1-メチルアデノシン、GABA、ヒポタウリン、グルタチオン (GSH)、1-メチルニコチンアミドが得られた (図 15)。これらの代謝物はいずれも SN-38 高感受性細胞で細胞内レベルが低く、SN-38 低感受性細胞で細胞内レベルが高かった。

【0069】

さらに、ヒポタウリン、グルタチオン、1-メチルニコチンアミドといったグルタチオン代謝系の物質の細胞内量と SN-38 感受性との間に有意な関連が認められたことから、グルタチオン代謝系に属するその他の物質の細胞内レベルと SN-38 感受性の関係について調べてみると、ヒポタウリン、グルタチオン、1-メチルニコチンアミドに加えて、タウリン ($R^2 = 0.688$)、グルタチオンジスルフィド (GSSG、 $R^2 = 0.63$)

10

20

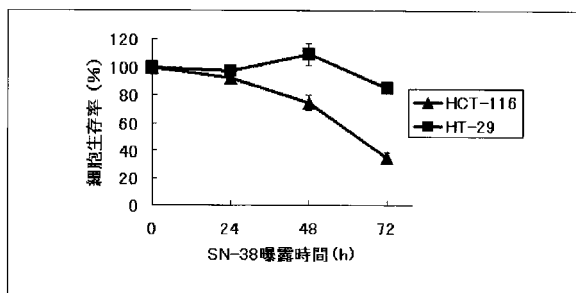
30

40

50

4)、S-アデノシルホモシステイン ($R^2 = 0.496$)、ニコチンアミド ($R^2 = 0.357$)、 γ -グルタミルシステイン (γ -Glu-Cys, $R^2 = 0.319$)、スペルミン ($R^2 = 0.295$) についてもその細胞内代謝物レベルとSN-38に対する感受性との間に関連が認められた(図16)。

【図1】

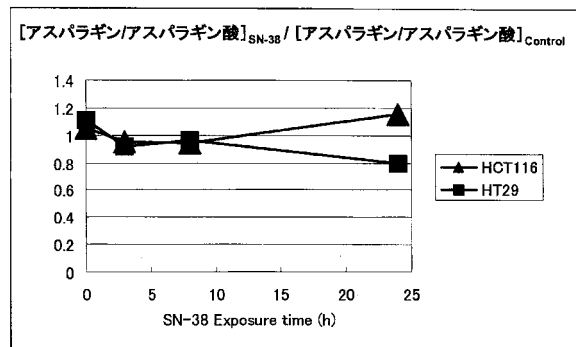


【図14】

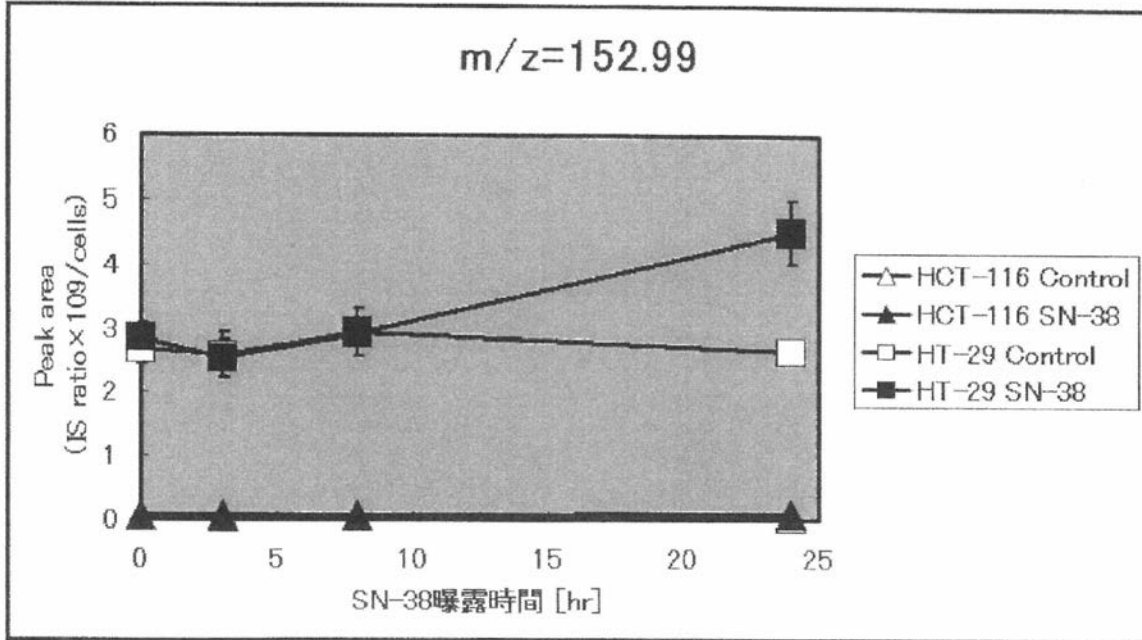
Cell lines	IC ₅₀ (nM)
HCT-15	6.21±1.46
HCT-116	1.84±1.16
HT-29	59.65±11.73
Lovo	7.89±6.06
LS174T	0.71±0.18
SW480	10.20±11.28
SW620	1.63±1.28
WiDr	63.27±10.95

Mean±S.D (n=3)

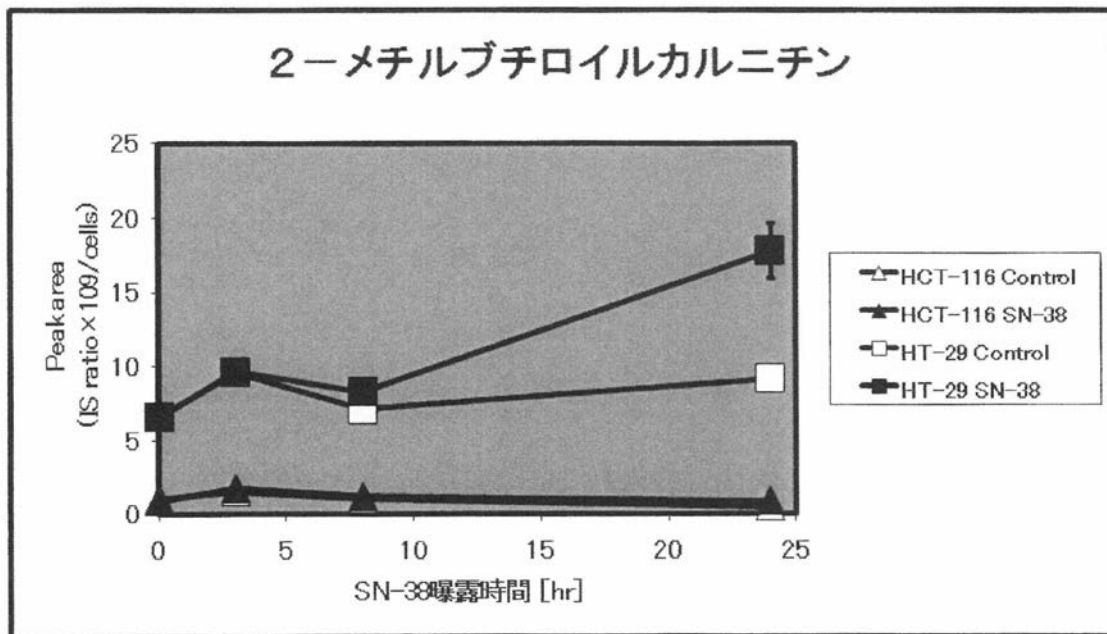
【図12】



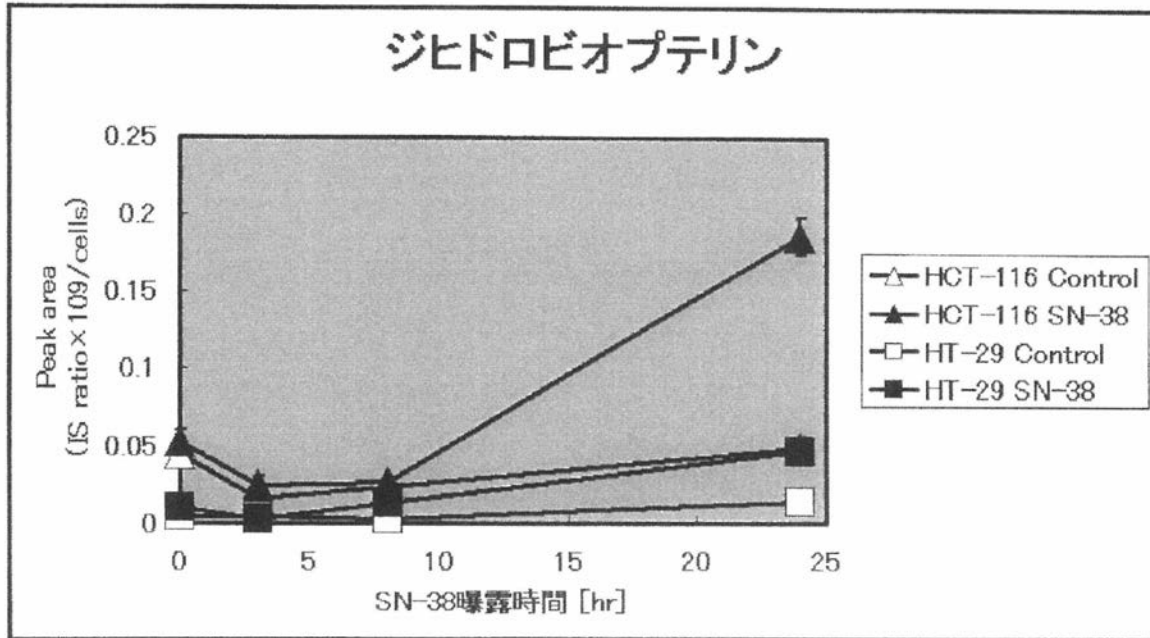
【 図 3 】



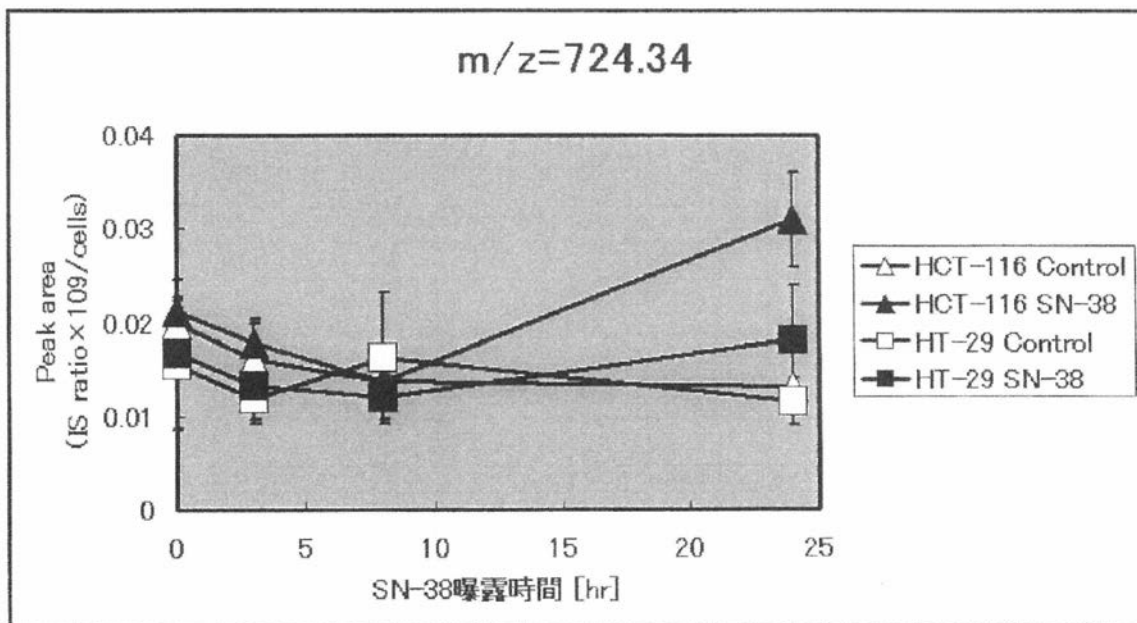
【 図 4 】



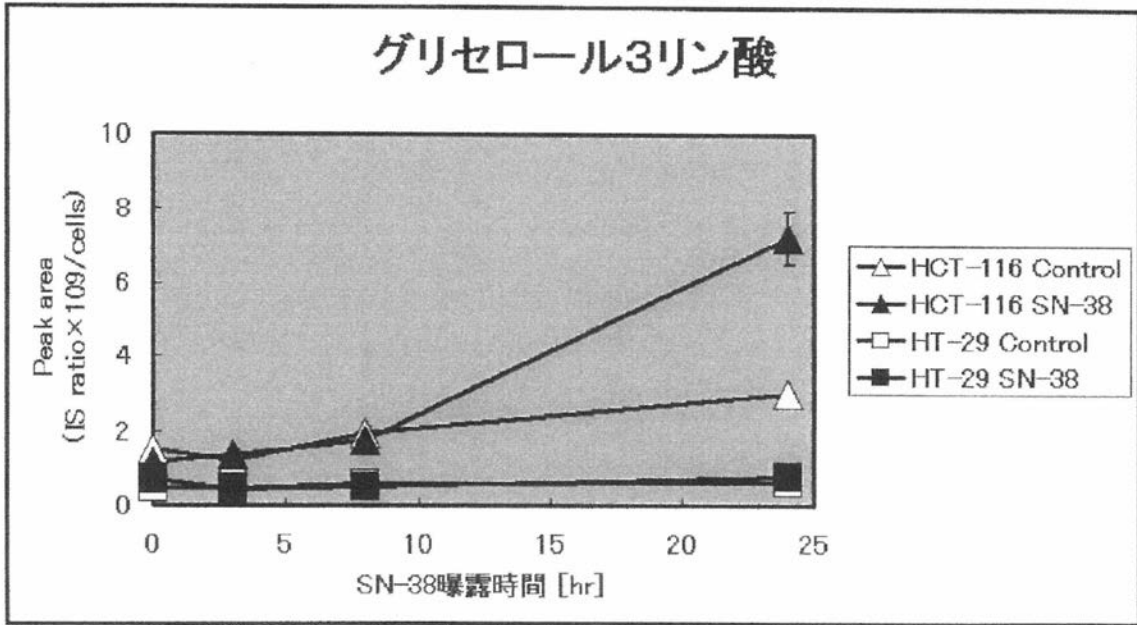
【 図 5 】



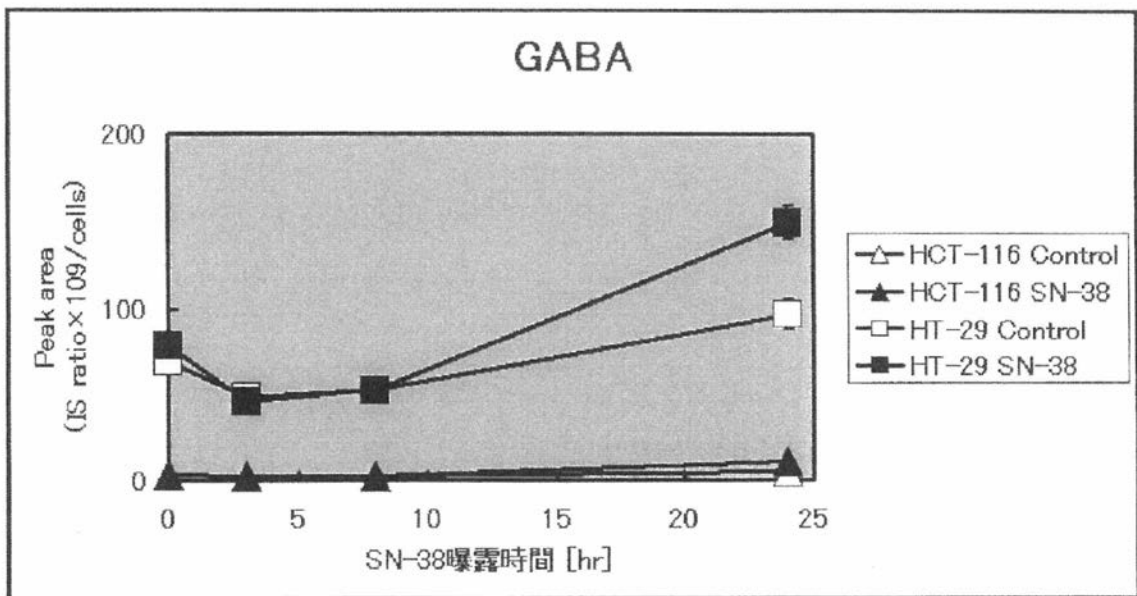
【 図 6 】



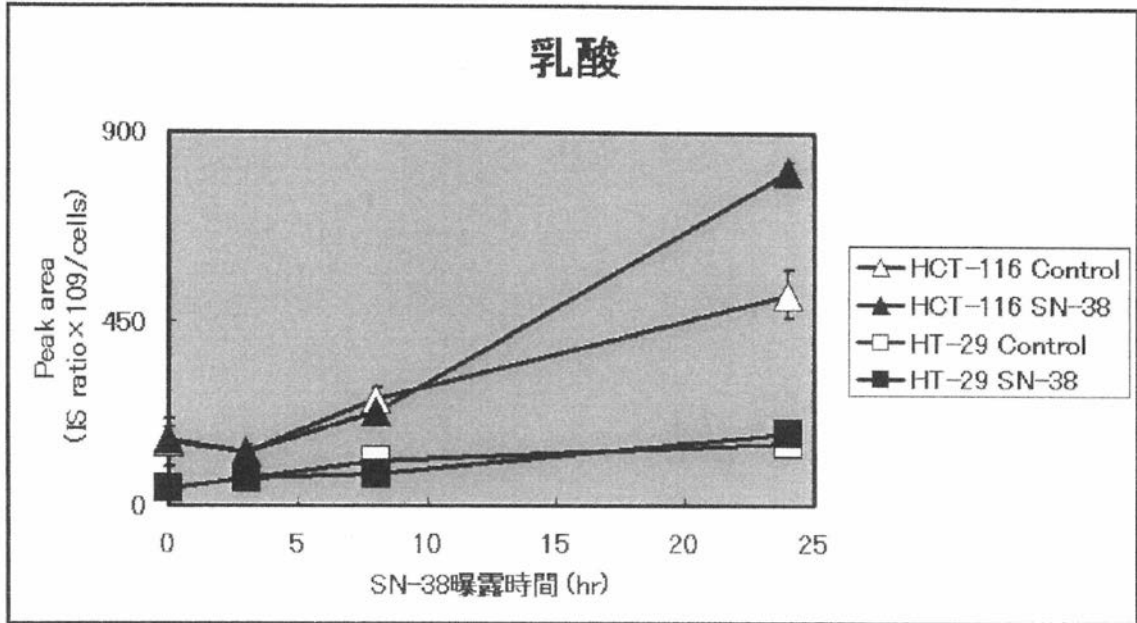
【 図 7 】



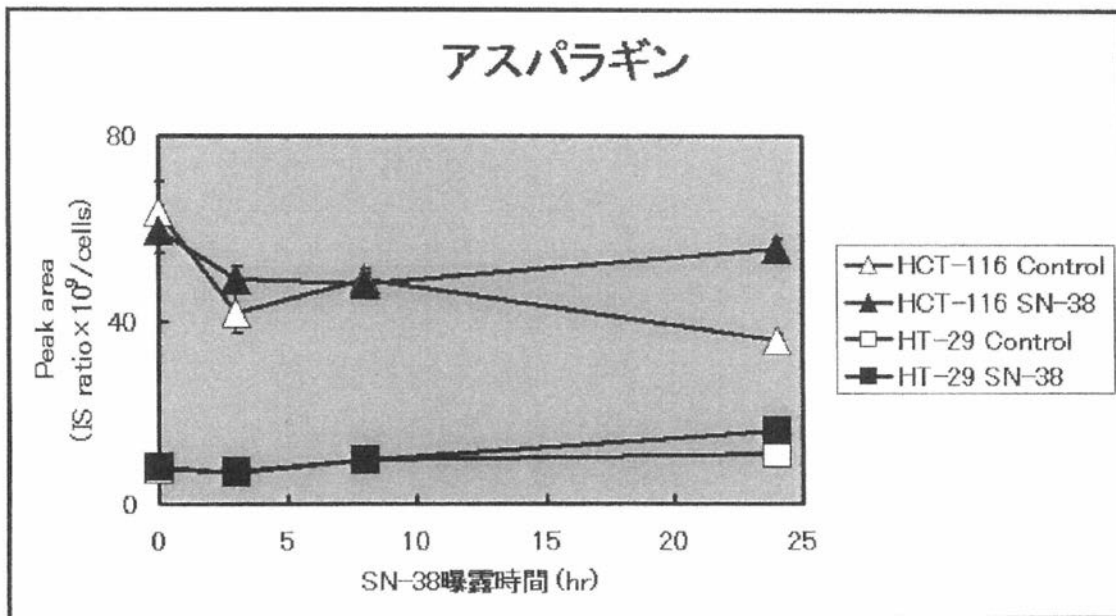
【 図 8 】



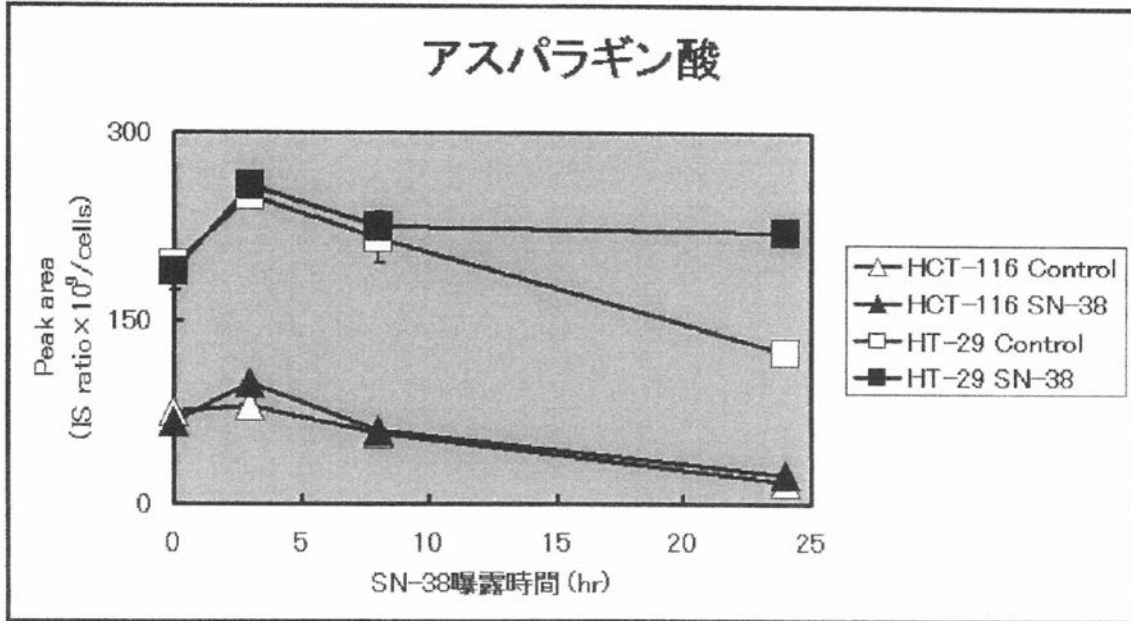
【 図 9 】



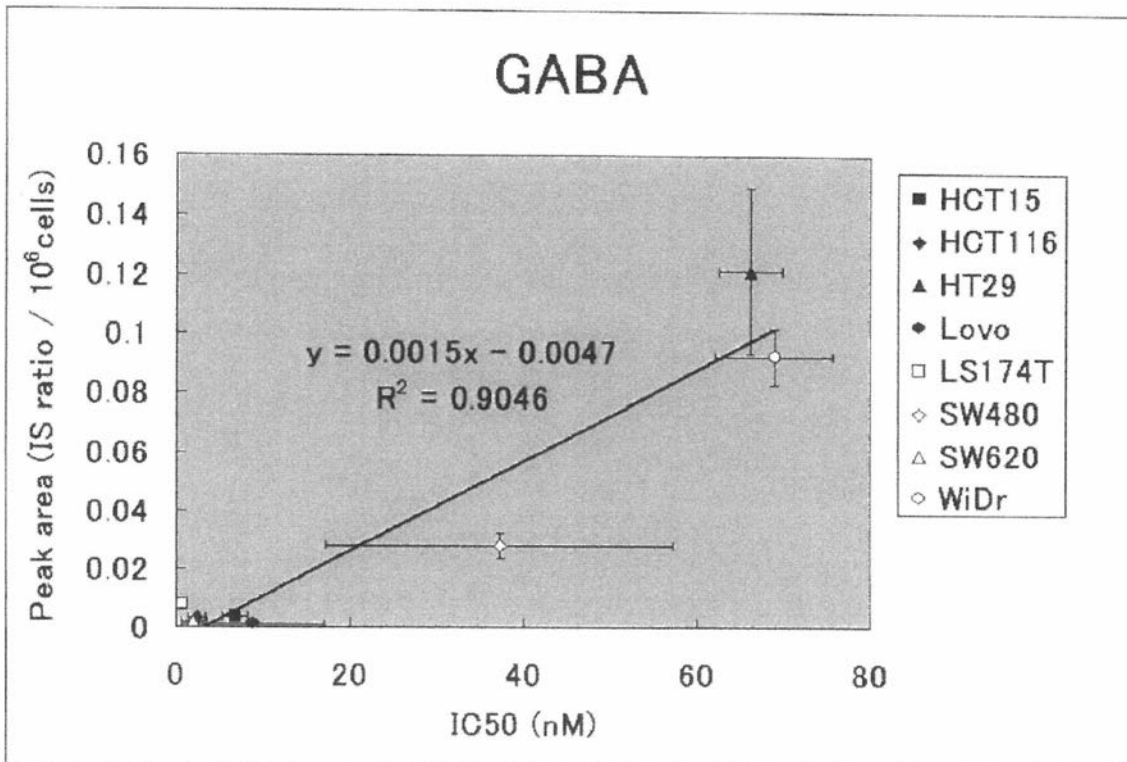
【 図 10 】



【 図 1 1 】



【 図 1 3 】



フロントページの続き

- (74)代理人 100111028
弁理士 山本 博人
- (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 鈴木 哲也
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 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
- (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 五十嵐 義晃
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

審査官 廣田 健介

- (56)参考文献 国際公開第2009/096189(WO, A1)
特開2005-341862(JP, A)
特開2003-038200(JP, A)
特表2007-503809(JP, A)
国際公開第2009/096196(WO, A1)
国際公開第2008/036691(WO, A2)
Tomoko Ohyama et al., Prediction of Anthracycline sensitivity by CDK profiling in combination with glutathione level, 第67回日本癌学会学術総会予稿集, 2008年, 390

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98
G01N 27/60 - 27/70
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)