

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6745048号
(P6745048)

(45) 発行日 令和2年8月26日(2020.8.26)

(24) 登録日 令和2年8月5日(2020.8.5)

(51) Int.Cl.	F I		
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q	1/48	Z
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N	33/53	D
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N	33/574	A
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M	1/34	E
請求項の数 21 (全 34 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2017-545487 (P2017-545487)
 (86) (22) 出願日 平成28年10月14日(2016.10.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2016/080544
 (87) 国際公開番号 W02017/065277
 (87) 国際公開日 平成29年4月20日(2017.4.20)
 審査請求日 平成31年4月25日(2019.4.25)
 (31) 優先権主張番号 特願2015-202960 (P2015-202960)
 (32) 優先日 平成27年10月14日(2015.10.14)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 日本国(JP)

(73) 特許権者 000003975
 日東紡績株式会社
 福島県福島市郷野目字東1番地
 (74) 代理人 110000855
 特許業務法人浅村特許事務所
 (72) 発明者 若林 真之
 福島県郡山市富久山町福原字塩島1番地
 日東紡績株式会社内
 (72) 発明者 佐藤 七月
 東京都千代田区麴町2-4-1 日東紡績
 株式会社内
 (72) 発明者 石原 英幹
 東京都千代田区麴町2-4-1 日東紡績
 株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 2種のプロテインキナーゼの活性測定を用いる解析方法による、薬剤感受性ヒト細胞株の判定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

癌細胞を区別する方法であって、

- 1) P I 3 K 阻害剤感受性であり M E K 阻害剤に非感受性である癌細胞、及び / 又は M E K 阻害剤感受性であり P I 3 K 阻害剤に非感受性である癌細胞を
- 2) P I 3 K 阻害剤および M E K 阻害剤の両方に非感受性である、及び / 又は P I 3 K 阻害剤および M E K 阻害剤の両方に感受性である癌細胞と

区別する方法であって、

癌細胞中の P I 3 K および M E K の酵素活性の比により区別することを特徴とする方法

。

【請求項2】

前記方法が、さらに総タンパク量を用いて補正することにより判定することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記方法が、さらに乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)の活性値を用いて補正することにより判定することを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記酵素活性が、P I 3 K または M E K に特異的に結合する抗体を用いて該酵素を捕捉することにより測定される請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記酵素活性が、P I 3 Kおよび/またはM E Kに特異的な基質を用いることにより測定される請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記酵素活性が、A D Pの生成量を測定することによって行われることを特徴とする請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

P I 3 K阻害剤またはM E K阻害剤の効果予測を判定するために使用される、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

P I 3 K阻害剤がウォルトマンニンである請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法 10

【請求項 9】

M E K阻害剤がトラメチニブである請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

癌細胞が組織試料である、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

組織試料が生検組織試料である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

生検組織試料が、トリプルネガティブ乳癌患者由来である請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

抗P I 3 K抗体と抗M E K抗体を含む、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の方法に用いるためのキットであって、

該方法は癌細胞中のP I 3 KおよびM E Kの酵素活性の比を参照標準と比較することを含む方法であり、以下を含むキット：

2 A) 前記抗M E K抗体を含むM E K測定用試薬

2 B) 前記抗P I 3 K抗体を含むP I 3 K測定用試薬

3 A) M E Kの基質ならびにA T Pを含むM E K測定用試薬

3 B) P I 3 Kの基質ならびにA T Pを含むP I 3 K測定用試薬。

【請求項 14】

1) 界面活性剤、プロテアーゼ阻害剤、脱リン酸化酵素阻害剤を含む細胞溶解用の第一試薬 30

2 A) 抗M E K抗体を含むM E K測定用第二試薬

2 B) 抗P I 3 K抗体を含むP I 3 K測定用第二試薬

3 A) M E Kの基質ならびにA T Pを含むM E K測定用第三試薬

3 B) P I 3 Kの基質ならびにA T Pを含むP I 3 K測定用第三試薬

4) D - G l u c o s e ; A D P - H e x o k i n a s e ; G l u c o s e - 6 - p h o s p h a t e d e h y d r o g e n a s e ; D i p h o r a s e並びにN A D Pを含む第四試薬

5) L u m i n o lとP e r o x i d a s eを含む第五試薬
ならびに 40

6) 界面活性剤を含む洗浄用第六試薬
を含む、P I 3 K活性ならびにM E K活性測定用キット。

【請求項 15】

P I 3 K活性 / M E K活性比の、抗がん剤の癌に対する効果予測因子としての使用。

【請求項 16】

抗がん剤が、P I 3 K阻害剤又は/及びM E K阻害剤である請求項 15 の使用。

【請求項 17】

癌がトリプルネガティブ乳癌である、請求項 15 又は 16 に記載の使用。

【請求項 18】

活性成分としてP I 3 K阻害剤を含む、癌細胞増殖抑制用医薬組成物であって； 50

該癌細胞は、P I 3 K 活性 / M E K 活性比が参照標準の P I 3 K 活性 / M E K 活性比と比較して大きい P I 3 K 阻害剤に感受性であることが、請求項 1 に記載の方法により、区別された癌細胞である、上記医薬組成物。

【請求項 19】

活性成分として M E K 阻害剤を含む、癌細胞増殖抑制用医薬組成物であって；
該癌細胞は、P I 3 K 活性 / M E K 活性比が参照標準の P I 3 K 活性 / M E K 活性比と比較して小さい M E K 阻害剤に感受性であることが、請求項 1 に記載の方法により、区別された癌細胞である、上記医薬組成物。

【請求項 20】

参照標準が P I 3 K 阻害剤および M E K 阻害剤の両方に感受性である細胞である、請求項 18 又は 19 に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

前記癌がトリプルネガティブ乳癌である、請求項 18 から 20 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、2種のプロテインキナーゼの活性測定を用いる解析方法による、癌細胞の新規サブタイプ分類法及び、該サブタイプ分類法に基づくガン細胞の薬剤感受性の判定方法に関する。さらに、生体由来の細胞のプロテインキナーゼの活性測定に基づく、該生体の薬剤効果判定方法を含む。

【背景技術】

【0002】

固形癌（悪性腫瘍）はその発症・転移部位により「乳」癌、「大腸」癌などと命名されているものの、その病因たる癌細胞は様々であり、分子生物学の発達と共に1つの組織の癌が様々に分類され、抗がん剤の効き目との相関関係が研究されてきた。

【0003】

乳癌は乳汁を分泌する乳腺小葉上皮、あるいは乳管までの通り道である乳管の上皮が悪性化したものであり、近年の日本人女性の悪性腫瘍のなかでは最も頻度の高いものとなっている。乳癌は B R C A 1 と B R C A 2 も含め、様々な遺伝子の関与が示唆され、その発現量により様々なサブタイプに分類されている。

たとえば、癌細胞の増殖のエストロゲン依存性に関係するエストロゲン受容体（E R）・プロゲステロン受容体（P g R）の発現量による分類や、がん遺伝子でもある受容体型チロシンキナーゼである H E R 2（H u m a n E G F R - R e l a t e d 2）の発現量による分類がそれである。

エストロゲン受容体（E R）・プロゲステロン受容体（P g R）の発現量の大きい癌には、抗エストロゲン薬（タモキシフェンなど）が有効であり、H E R 2 の発現が高い癌には抗 H E R 2 モノクローナル抗体である、トラスツズマブなどが有効であり、患者に投与される。

従って、乳がんは、エストロゲン受容体（E R）・プロゲステロン受容体（P g R）の発現量の大きい場合や H E R 2 の発現が高い場合には病理学的完全奏効（p C R）率が高い。すなわち、

1：（E R・P g R 陽性、H E R 2 陽性）＝（抗エストロゲン薬感受性、抗 H E R 2 モノクローナル抗体感受性）（ルミナル B（H E R 2 陽性）型）、

2：（E R・P g R 陽性、H E R 2 陰性）＝（抗エストロゲン薬感受性、抗 H E R 2 モノクローナル抗体非感受性）（ルミナル A 型又はルミナル B（H E R 2 陰性）型）、又は

3：（E R・P g R 陰性、H E R 2 陽性）＝（抗エストロゲン薬非感受性、抗 H E R 2 モノクローナル抗体感受性）（非ルミナル型）

の場合は、p C R 率が高い。

10

20

30

40

50

【0004】

HER2やERは治療法の効果との間に関連性があるため、効果予測因子と呼ばれており、臨床において応用されている（非特許文献10）。一方、その因子の有無と予後が相関する因子のことを予後因子という。PgRは現在予後因子と考えられている。効果予測因子の検出には、主として腫瘍組織サンプルの免疫組織化学的方法（IHC法）が多用されている。腫瘍細胞の染色強度と染色された細胞の比率の両方を加味する方法（Allred Scoreなど）や染色強度を評価せず染色された腫瘍細胞の比率のみで判定する方法（J-Scoreなど）のいずれかが用いられる。

HER2の場合、一般にIHC法で検査し、その結果が0あるいは1+の場合は陰性、3+の場合は陽性、2+の場合はFISH法（Fluorescence in situ hybridization）によって増幅の有無を調べ、増幅があれば陽性、なければ陰性と判定する。

ERの場合、Allred Scoreでは3～8が陽性とされる一方、染色細胞の比率で判定する場合は10%をカットオフ値とすることが多かったが、1%でも存在する場合は、ER陽性と判定すべきとの意見もある。いずれにせよ、一定のカットオフ値を設定すれば、これらの遺伝子（効果予測因子）が陽性と判断された場合、効果的な治療レジメンの指針となりうる。

【0005】

しかしながら、乳癌細胞の中には、ER、PgR及びHER2のいずれの発現も確認されず、上記抗エストロゲン薬やHER2モノクローナル抗体が抗がん剤として効かないトリプルネガティブ乳癌（TNBC）（ER陰性、PgR陰性、HER2陰性）というものがあることが報告されている。

トリプルネガティブ乳癌（TNBC）は全乳がん中11～23%存在し、現在予後不良とされている。上記標的的特異的な薬剤だけでなく、その他の一般的な抗がん剤の効き目も患者によって異なっており、さらなるサブタイプ化が必要であることが示唆されている（非特許文献7、8）。

現在TNBCは遺伝子プロファイルにより、アカデミックには少なくとも以下の6種類のサブタイプに分類できることが示されている：

二種類のbasal-like（BL1とBL2）サブタイプ（細胞周期関連遺伝子やDNA傷害応答性遺伝子が高発現）；

Immunomodulatory（IM）サブタイプ（免疫反応に関連した遺伝子が高発現）；

Mesenchymal（M）サブタイプ（TGF- β やWnt/ β -cateninシグナルに関連した遺伝子が高発現）；

Mesenchymal-stem like（MSL）サブタイプ（Mタイプ発現 + 幹細胞関連遺伝子高発現）；

Luminal androgen receptor（LAR）サブタイプ（ARやluminal関連遺伝子の高発現）。

しかしながら、このような遺伝子発現プロファイルは、癌細胞の薬剤感受性と関連付けるのは難しく、現在基礎研究が行われる最中である（特許文献1、2、3；非特許文献1、2、9）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2009-050183号公報

【特許文献2】特開2013-174616号公報

【特許文献3】特表2007-503809号公報

【特許文献4】特表2010-507384号公報

【特許文献5】特表2010-536371号公報

【特許文献6】特表2015-505959号公報

【0007】

【非特許文献1】Harris L1, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, So

10

20

30

40

50

merfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr, American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Nov 20;25(33):5287-312. Epub 2007 Oct 22.

【非特許文献 2】Leung EY, Kim JE, Askarian-Amiri M, Rewcastle GW, Finlay GJ, Baguley BC. Relationships between signaling pathway usage and sensitivity to a pathway inhibitor: examination of trametinib responses in cultured breast cancer lines. *PLoS One*. 2014 Aug 29;9(8):e105792.

【非特許文献 3】Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, Basecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Mazzarino MC, Nicoletti F, Libra M, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Montalto G, Cervello M, Laidler P, Milella M, Tafuri A, Bonati A, Evangelisti C, Cocco L, Martelli AM, McCubrey JA. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget*. 2011 Mar;2(3):135-64.

【非特許文献 4】Yuen HF, Abramczyk O, Montgomery G, Chan KK, Huang YH, Sasazuki T, Shirasawa S, Gopesh S, Chan KW, Fennell D, Janne P, El-Tanani M, Murray JT. Impact of oncogenic driver mutations on feedback between the PI3K and MEK pathways in cancer cells. *Biosci Rep*. 2012 Aug;32(4):413-22.

【非特許文献 5】Jing J, Greshock J, Holbrook JD, Gilmartin A, Zhang X, McNeil E, Conway T, Moy C, Laquerre S, Bachman K, Wooster R, Degenhardt Y. Comprehensive predictive biomarker analysis for MEK inhibitor GSK1120212. *Mol Cancer Ther*. 2012 Mar;11(3):720-9.

【非特許文献 6】Klammer M, Kaminski M, Zedler A, Oppermann F, Blencke S, Marx S, Muller S, Tebbe A, Godl K, Schaab C Phosphosignature predicts dasatinib response in non-small cell lung cancer. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Sep;11(9):651-68.

【非特許文献 7】Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. : Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 121 : 2750-2767, 2011 .

【非特許文献 8】Toss A, Cristofanilli M. Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2015 Apr 23;17(1):60.

【非特許文献 9】Tomao F, Papa A, Zaccarelli E, Rossi L, Caruso D, Minozzi M, Vicini P, Frati L, Tomao S. Triple-negative breast cancer: new perspectives for targeted therapies. *Onco Targets Ther*. 2015 Jan 16;8:177-93. doi: 10.2147/OTT.S67673. eCollection 2015. Review.

【非特許文献 10】科学的根拠に基づく乳癌治療ガイドライン 1 . 治療編 (日本乳癌学会)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本願発明者らも癌細胞のプロファイリングにより、抗がん剤の投与指針を決めることができないか研究を続け、複数の遺伝子発現プロファイルでなく、複数のシグナルカスケードによりサブタイプに分類できるのではないかと作業仮説を打ち立てた。

その作業仮説に基づき、本願発明者らは様々な複数のカスケードで癌細胞の分類化ができないか模索した。しかしながら、既存の遺伝子発現量に基づく分類では、本願明細書比較例に示すように、有意な相関関係が得られなかった。

しかしながら、本願発明者らは自らの作業仮説を信じ、さらに鋭意研究を行い、以下に述べる手段により、みずからの作業仮説を立証した。

従って、本願発明の解決すべき課題は、上記作業仮説の立証であり、より具体的には、癌細胞の新規サブタイプ分類法及び、該サブタイプ分類法に基づくガン細胞の薬剤耐性の判定方法を提供することである。かかる方法は、たとえば癌患者から単離した癌組織細胞

10

20

30

40

50

を用いて、当該癌細胞の薬剤感受性を判定し、その結果を当該癌患者の薬剤治療の際に用いることなどにも応用できる。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本願発明者らは、鋭意研究と様々な試行錯誤（比較例参照）を繰り返した。上記で述べた関連遺伝子の発現量、発現パターン、変異パターン、シグナル伝達経路に含まれる分子のリン酸化パターン、リン酸化量等間接的な因子の測定方法などを試したものの、いずれも有意な相関関係を得ることが出来ず、唯一以下の態様のみにおいて、シグナルカスケードと薬剤耐性の相関関係を得ることができた。

【0010】

すなわち、本発明は、癌の生存増殖に関連する2種類の主要なシグナル伝達経路を担うキナーゼであるMEK及びPI3Kの酵素活性を直接測定し、またはさらに補正因子（例えば細胞数を反映する総タンパク量や阻害剤有無に左右されない細胞内タンパク発現量など）を用いることで、（PI3K阻害剤感受性・MEK阻害剤感受性）、（PI3K阻害剤感受性・MEK阻害剤非感受性）、（PI3K阻害剤非感受性・MEK阻害剤感受性）、（PI3K阻害剤非感受性・MEK阻害剤非感受性）の4つのサブタイプに癌細胞を分類する方法である。

【0011】

キナーゼ（Kinase）とは、ATPなどの高エネルギーリン酸結合を有する分子からリン酸基をターゲット分子に転移する（リン酸化する）酵素の総称であり（酵素番号：EC 2.7.1~2.7.4）、ホスファターゼとは、該ターゲット分子から加水分解し、リン酸基を解離させる酵素の総称である。

リン酸化は通常、真核生物の場合、タンパク質のセリン、トレオニン、そしてチロシンの残基に起こり、その標的により、キナーゼは主としてセリン/トレオニンキナーゼとチロシンキナーゼに分類される。

キナーゼ自身が、膜受容体であったり、他のキナーゼのターゲット分子であったりすることにより、細胞内において複雑なシグナルネットワークを形成する。

たとえば、チロシンキナーゼ（あるいは蛋白質チロシンキナーゼ、Protein Tyrosine Kinase; PTK、EC 2.7.10.）は、細胞の分化、増殖、接着、あるいは免疫反応などに関わるシグナル伝達に関与し、増殖因子が結合することによって活性化する受容体型と、増殖因子が結合しない非受容体型の2型に大別される。チロシンキナーゼが活性化されると、受容体自身、あるいは標的とするタンパクを特異的にリン酸化する。受容体自身の自己リン酸化により、このリン酸化部位を認識するさまざまなシグナル伝達因子が受容体に結合し、シグナル伝達が始まる。また標的タンパクのリン酸化により、細胞内のさまざまなタンパクが次々と活性化し、シグナル伝達が始まる。ヒトのチロシンキナーゼは100種類以上あると報告されており、がん、アテローム性動脈硬化症や乾癬などでは、過剰に活性化していることが報告されている。

【0012】

「PI3K」（Phosphoinositide 3-kinase; EC 2.7.1.137）は、細胞膜の構成成分であるイノシトールリン脂質のイノシトール基3位のヒドロキシル基のリン酸化を行う酵素である。

EC番号（酵素番号：Enzyme Commission numbers）は酵素を整理すべく反応形式に従ってECに続く4組の数字で表したものであり、国際生化学連合（現在のNC-IUBMB）の酵素委員会によって規定されたものである。たとえばPI3Kであれば、

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC2/7/1/137.html>

にその定義が記載されている。

PI3Kは、構造によりClass I、II、IIIに分類される。

クラスI PI3Kはヘテロ二量体であり、アミノ酸配列の相同性からクラスIAとクラスIBにさらに分けられる。クラスIAは p110、および からなり、調節

10

20

30

40

50

サブユニットである p 8 5 、 p 5 5 、 p 5 0 、 p 8 5 および p 5 5 と結合している。p 8 5 、 p 5 5 、 p 5 0 は同一遺伝子 (P i k 3 r 1) のスプライシングバリエーションであり、 p 8 5 と p 5 5 はそれぞれ P i k 3 r 2 および P i k 3 r 3 遺伝子に由来する。クラス I A は P K B (Protein Kinase-B) (セリン・スレオニンキナーゼの A k t (v-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene)) の活性化に関与している。一方、クラス I B P I 3 K である p 1 1 0 は哺乳類においてのみ発現が見られ、Gタンパク質のサブユニットや p 1 0 1 によってその機能を調節される。クラス I B の P I 3 キナーゼは主に Gタンパク質共役受容体 (G P C R) からの刺激により活性化され、 P t d I n s (3 , 4) P 2 のリン酸化により産生された P t d I n s (3 , 4 , 5) P 3 は細胞内情報伝達機構においてセカンドメッセンジャーとして機能する。

10

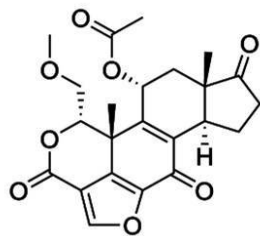
クラス I I には 、 および の 4 つが存在するが、いずれも調節サブユニットを有さず単量体で酵素活性を示す。

クラス I I I P I 3 K は P t d I n s から P t d I n s (3) P を産生し機能的にはクラス I I に近いが、構造的にはクラス I により類似しておりヘテロ二量体を形成して機能する。クラス I I I P I 3 K はタンパク質輸送などに関与している。

【 0 0 1 3 】

「 P I 3 K 阻害薬」としては、これに限定されないがウォルトマンニン (W o r t m a n n i n) (C ₂₃ H ₂₄ O ₈ = 4 2 8 . 4 4 C A S 番号 1 9 5 4 5 - 2 6 - 7)

【 化 1 】



20

や L Y 2 9 4 0 0 2 、 A S 6 0 5 2 4 0 や Z S T K 4 7 4 、 P I 3 K 特異的阻害薬である I C 4 8 6 0 6 8 や I C 8 7 1 1 4 などがある。

【 0 0 1 4 】

M E K とは M A P k i n a s e - E R K k i n a s e K i n a s e 又は M A P (M i t o g e n - a c t i v a t e d p r o t e i n) キナーゼキナーゼ (M A P K K) を意味し、 M A P キナーゼの活性化に必須のトレオニン・セリン残基のリン酸化を行う酵素である (E C 2 . 7 . 1 2 . 2) 。

30

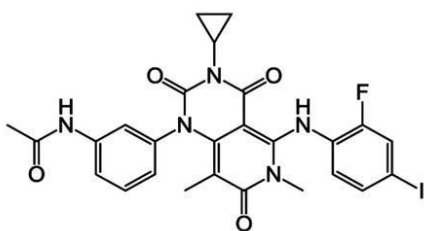
E R K 1 / 2 の活性化には M E K 1 及び M E K 2 が、 J N K サブファミリーには M E K 4 及び M E K 7 が、 p 3 8 サブファミリーには M E K 3 及び M E K 6 が、 E R K 5 サブファミリーの活性化には M E K 5 が各々関与している。

【 0 0 1 5 】

「 M E K 阻害薬」としては、これに限定されないがトラメチニブ (C ₂₆ H ₂₃ F I N ₅ O ₄ = 6 1 5 . 3 9 4 8 C A S : 8 7 1 7 0 0 - 1 7 - 3)

40

【 化 2 】



や S L 3 2 7 、 U 0 1 2 6 、 P D 1 8 4 3 5 2 、 P D - 9 8 0 5 9 などがある。

50

【 0 0 1 6 】

ウォルトマンニンが全てのサブクラスの P I 3 K 阻害薬であるのに対し、トラメチニブは M E K 1 及び M E K 2 を特異的に阻害する。

【 0 0 1 7 】

M E K は E R K - M A P K 経路 (増殖シグナル経路) に関与する遺伝子である。細胞膜の増殖因子受容体にリガンド (増殖因子) が結合し 2 量体化すると、アダプター分子、低分子量 G 蛋白質 R a s を経由して、 R a f M E K E R K とリン酸化反応する M A P K 経路 (M A P K カスケード) によりシグナルが伝達される。活性化した E R K は最終的に核へ移行し、転写因子が活性化され、細胞増殖、細胞分化の遺伝子が発現する (E R K - M A P K 経路) 。

10

一方、P I 3 K は、P I 3 K - A k t 経路 (生存シグナル経路) のトリガーとなる遺伝子である。増殖因子による刺激は、同時にアポトーシス誘導を抑制する経路にも伝わり、細胞死を防ぐ。このアポトーシス抑制活性の経路は P I 3 K のリン酸化活性から始まり、A k t のリン酸化を通して、細胞の生存やアポトーシス誘導を阻害する (P I 3 K - A k t 経路) 。

【 0 0 1 8 】

キナーゼ活性測定の主要な方法は以下で構成される。

1) 細胞からタンパク質の抽出を行い、試料液中に存在するターゲットキナーゼに特異的な抗体を加えて該キナーゼを捕捉した後、該キナーゼに特異的な基質を加え酵素反応をさせる。

20

2) その後酵素反応の生成物である A D P を測定し、活性に換算する。

P I 3 K 阻害剤および / または M E K 阻害剤に感受性なヒト癌細胞を判定するための解析方法は、

1) 得られたキナーゼの活性値の比 (P I 3 K / M E K)

2) 得られたキナーゼの活性値を公知の方法で測定される総タンパク量で補正した値

3) 得られたキナーゼの活性値を公知の方法で測定される L D H (乳酸デヒドロゲナーゼ) で補正した値のいずれかをを用い、各阻害剤の各細胞株に対する I C 5 0 (5 0 % 阻害濃度) との対応関係を解析した。

複数の癌細胞株について、M E K および P I 3 K 活性の測定および解析を行うことにより、高確率で P I 3 K および / または M E K 阻害剤に感受性である細胞株を選び出すことが可能となった。

30

【 0 0 1 9 】

従って、本発明は本発明の構成は以下の [1] から [2 6] の通りである。

[1] 癌細胞を分類する方法であって、

1) P I 3 K 阻害剤および M E K 阻害剤の両方に非感受性である、

2) P I 3 K 阻害剤感受性であり M E K 阻害剤に非感受性である、

3) M E K 阻害剤感受性であり P I 3 K 阻害剤に非感受性である、または

4) P I 3 K 阻害剤および M E K 阻害剤の両方に感受性である、

のいずれかに分類する方法 ; 好ましくは

癌細胞を区別する方法であって、

40

1) P I 3 K 阻害剤感受性であり M E K 阻害剤に非感受性である癌細胞、及び / 又は M E K 阻害剤感受性であり P I 3 K 阻害剤に非感受性である癌細胞を

2) P I 3 K 阻害剤および M E K 阻害剤の両方に非感受性である、及び / 又は

P I 3 K 阻害剤および M E K 阻害剤の両方に感受性である癌細胞と

区別する方法 ;

[2] 前記方法が、癌細胞中の P I 3 K および M E K の酵素活性を用いて判定することを特徴とする [1] の方法 ;

[3] 前記方法が、癌細胞中の P I 3 K および M E K の酵素活性の比により判定することを特徴とする [1] または [2] の方法 ;

[4] 前記方法が、さらに総タンパク量を用いて補正することにより判定することを特徴

50

- とする [1] または [2] の方法 ;
- [5] 前記方法が、さらに乳酸デヒドロゲナーゼ (L D H) の活性値を用いて補正することにより判定することを特徴とする [1] または [2] の方法 ;
- [6] 前記酵素活性が、 P I 3 K または M E K に特異的に結合する抗体を用いて該酵素を捕捉することにより測定される [1] から [5] のいずれかの方法 ;
- [7] 前記酵素活性が、 P I 3 K および / または M E K に特異的な基質を用いることにより測定される [1] から [6] のいずれかの方法 ;
- [8] 前記酵素活性が、 A D P の生成量を測定することによって行われることを特徴とする [1] から [7] のいずれかの方法 ;
- [9] P I 3 K 阻害剤または M E K 阻害剤の効果予測を判定するために使用される、 [1] から [8] のいずれかの方法 ; 10
- [10] P I 3 K 阻害剤がウォルトマンニンである [1] から [9] のいずれかの方法 ;
- [11] M E K 阻害剤がトラメチニブである [1] から [9] のいずれかの方法 ;
- [12] 癌細胞が単離された組織試料である、 [1] から [11] のいずれかの方法 ;
- [13] 組織試料が生検組織試料である、 [12] の方法 ;
- [14] 生検組織試料が、トリプルネガティブ乳癌患者由来である [13] の方法。
- 【 0020 】
- [15] 抗 P I 3 K 抗体と抗 M E K 抗体を含む、 [1] から [14] のいずれかの方法に用いるためのキット。 20
- 【 0021 】
- [16] 1) 界面活性剤、プロテアーゼ阻害剤、脱リン酸化酵素阻害剤を含む細胞溶解用の第一試薬
- 2 A) 抗 M E K 抗体を含む M E K 測定用第二試薬
- 2 B) 抗 P I 3 K 抗体を含む P I 3 K 測定用第二試薬
- 3 A) M E K の基質ならびに A T P を含む M E K 測定用第三試薬
- 3 B) P I 3 K の基質ならびに A T P を含む P I 3 K 測定用第三試薬
- 4) D - G l u c o s e ; A D P - H e x o k i n a s e ; G l u c o s e - 6 - p h o s p h a t e d e h y d r o g e n a s e ; D i p h o r a s e 並びに N A D P を含む第四試薬
- 5) L u m i n o l と P e r o x i d a s e を含む第五試薬 30
- ならびに
- 6) 界面活性剤を含む洗浄用第六試薬
- を含む、 P I 3 K 活性ならびに M E K 活性測定用キット ;
- [17] 1) 対象組織細胞を第一試薬で溶解し ;
- 2 A) 該溶解物の一部に M E K 測定用第二試薬に添加して、対象組織細胞中の M E K を回収し ; 任意で洗浄用第六試薬で回収した M E K を洗浄後、 M E K 測定用第三試薬を添加反応後、第四試薬添加反応、第五試薬添加反応して、 M E K 活性を測定し ;
- 2 B) 該溶解物の一部に P I 3 K 測定用第二試薬に添加して、対象組織細胞中の M E K を回収し ; 任意で洗浄用第六試薬で回収した P I 3 K を洗浄後、 P I 3 K 測定用第三試薬を添加反応後、第四試薬添加反応、第五試薬添加反応して、 P I 3 K 活性を測定するための、 [16] のキット。 40
- 【 0022 】
- [18] 活性成分として P I 3 K 阻害剤を含む、癌細胞増殖抑制用医薬組成物であって ; 該癌細胞の P I 3 K 活性 / M E K 活性比が参照標準の P I 3 K 活性 / M E K 活性比と比較して大きい、上記医薬組成物。
- [19] P I 3 K 活性 / M E K 活性比が参照標準の P I 3 K 活性 / M E K 活性比と比較して大きい癌細胞を含む癌治療における使用のための、 P I 3 K 阻害剤 ;
- [20] P I 3 K 活性 / M E K 活性比が参照標準の P I 3 K 活性 / M E K 活性比と比較して大きい癌細胞の増殖抑制用医薬の製造における、 P I 3 K 阻害剤の使用 ;
- [21] P I 3 K 活性 / M E K 活性比が参照標準の P I 3 K 活性 / M E K 活性比と比較し 50

て大きい癌細胞を含む癌治療の方法であって、癌患者にP I 3 K阻害剤を投与することを含む、方法；

ここで、参照標準はP I 3 K阻害剤およびM E K阻害剤の両方に非感受性である、又はP I 3 K阻害剤およびM E K阻害剤の両方に感受性である細胞組織であってよく；

癌細胞は乳癌細胞、好ましくはトリプルネガティブ乳癌細胞であってよい。

【 0 0 2 3 】

[2 2] 活性成分としてM E K阻害剤を含む、癌細胞増殖抑制用医薬組成物であって；
該癌細胞のP I 3 K活性 / M E K活性比が参照標準のP I 3 K活性 / M E K活性比と比較して小さい、上記医薬組成物；

[2 3] P I 3 K活性 / M E K活性比が参照標準のP I 3 K活性 / M E K活性比と比較して小さい癌細胞を含む癌治療における使用のための、M E K阻害剤；

[2 4] P I 3 K活性 / M E K活性比が参照標準のP I 3 K活性 / M E K活性比と比較して小さい癌細胞の増殖抑制用医薬の製造における、M E K阻害剤の使用；

[2 5] P I 3 K活性 / M E K活性比が参照標準のP I 3 K活性 / M E K活性比と比較して小さい癌細胞を含む癌治療の方法であって、癌患者にM E K阻害剤を投与することを含む、方法；

ここで、参照標準はP I 3 K阻害剤およびM E K阻害剤の両方に非感受性である、又はP I 3 K阻害剤およびM E K阻害剤の両方に感受性である細胞組織であってよく、

癌細胞は乳癌細胞、好ましくはトリプルネガティブ乳癌細胞であってよい。

【 0 0 2 4 】

[2 6] 癌の診断治療の方法であって、

1) 患者から癌細胞組織を採取し、

2) 採取された癌細胞のM E K活性とP I 3 K活性を測定し、

3) P I 3 K活性 / M E K活性比が、参照標準のP I 3 K活性 / M E K活性比と比較して

大きい場合は、P I 3 K阻害剤を該患者に投与し；

小さい場合は、M E K阻害剤を該患者に投与する

ことを含む方法であって；

ここで、参照標準はP I 3 K阻害剤およびM E K阻害剤の両方に非感受性である、又はP I 3 K阻害剤およびM E K阻害剤の両方に感受性である細胞組織であってよく

癌は乳癌、好ましくはトリプルネガティブ乳癌である。

【 0 0 2 5 】

[2 7] P I 3 K活性 / M E K活性比の、抗がん剤の癌に対する効果予測因子としての使用；

[2 8] 抗がん剤が、P I 3 K阻害剤又は / 及びM E K阻害剤である [2 7] の使用；

[2 9] 癌がトリプルネガティブ乳癌である、 [2 7] 又は [2 8] の使用。

【 発明の効果 】

【 0 0 2 6 】

キナーゼを阻害する薬剤開発及びそれに関するコンパニオン診断技術の開発が盛んに進められている。診断技術としては、シグナル伝達に関連する遺伝子の発現量や変異パターンを確認する方法があり、実臨床に使用されている。

抗癌剤開発ではキナーゼ活性を直接阻害する薬剤が分子標的薬として様々に開発されている一方で、それらの有効性すなわち、キナーゼ活性の阻害程度を直接評価する診断技術は存在せず、公知のコンパニオン診断技術としては、がん関連遺伝子の発現量、発現パターン、変異パターン、シグナル伝達経路に含まれる分子のリン酸化パターン、リン酸化量等間接的な因子の測定方法に留まっている。それら測定される因子を用いた解析では、各種分子標的薬の効果を予測するのに十分な情報を必ずしも提供できるとは限らない。

かかる状況において本願発明は、新しい研究アプローチ及びそれに基づく新たな癌細胞の分類方法を提供し、キナーゼを阻害する薬剤開発及びそれに関するコンパニオン診断技術の開発の一助となることができる。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1A】各薬剤の阻害率による細胞株の分類 薬剤濃度 $1 \mu\text{M}$ における 25% 増殖阻害率を指標にした。

【図1B】各薬剤の阻害率による細胞株の分類 薬剤濃度 100 nM における 12.5% 増殖阻害率を指標にした。

【図1C】各薬剤の阻害率による細胞株の分類 薬剤濃度 $10 \mu\text{M}$ における 50% 増殖阻害率を指標にした。

【図2】PI3K活性/MEK活性値による細胞分類との比較

【図3】PI3K発現量/MEK発現量値による細胞分類との比較(比較例1)

【図4】リン酸化PI3K発現量/リン酸化MEK発現量値による細胞分類との比較(比較例2)

【図5】リン酸化AKT発現量/リン酸化ERK発現量値による細胞分類との比較(比較例3)

【図6】X:PI3K活性/LDH活性、Y:MEK活性/LDH活性によるグリッド解析

【図7】X:PI3K発現量/LDH活性、Y:MEK発現量/LDH活性によるグリッド解析(比較例4)

【図8】X:リン酸化PI3K発現量/LDH活性、Y:リン酸化MEK発現量/LDH活性によるグリッド解析(比較例5)

【図9】X:リン酸化AKT発現量/LDH活性、Y:リン酸化ERK発現量/LDH活性によるグリッド解析(比較例6)

【図10】X:PI3K活性/MEK活性、Y:PI3K活性/LDH活性によるグリッド解析

【図11】X:PI3K発現量/MEK発現量、Y:PI3K発現量/LDH活性によるグリッド解析(比較例7)

【図12】X:リン酸化PI3K発現量/リン酸化MEK発現量、Y:リン酸化PI3K発現量/LDH活性によるグリッド解析(比較例8)

【図13】X:リン酸化AKT発現量/リン酸化ERK発現量、Y:リン酸化AKT発現量/LDH活性によるグリッド解析(比較例9)

【図14】X:PI3K活性/MEK活性、Y:MEK活性/LDH活性によるグリッド解析

【図15】X:PI3K発現量/MEK発現量、Y:MEK発現量/LDH活性によるグリッド解析(比較例10)

【図16】X:リン酸化PI3K発現量/リン酸化MEK発現量、Y:リン酸化MEK発現量/LDH活性によるグリッド解析(比較例11)

【図17】X:リン酸化AKT発現量/リン酸化ERK発現量、Y:リン酸化ERK発現量/LDH活性によるグリッド解析(比較例12)

【図18】X:PI3K活性/総タンパク量、Y:MEK活性/総タンパク量によるグリッド解析

【図19】X:PI3K発現量/総タンパク量、Y:MEK発現量/総タンパク量によるグリッド解析(比較例13)

【図20】X:リン酸化PI3K発現量/総タンパク量、Y:リン酸化MEK発現量/総タンパク量によるグリッド解析(比較例14)

【図21】X:リン酸化AKT発現量/総タンパク量、Y:リン酸化ERK発現量/総タンパク量によるグリッド解析(比較例15)

【図22】X:PI3K活性/MEK活性、Y:PI3K活性/総タンパク量によるグリッド解析

【図23】X:PI3K発現量/MEK発現量、Y:PI3K発現量/総タンパク量によるグリッド解析(比較例16)

10

20

30

40

50

【図24】X：リン酸化PI3K発現量/リン酸化MEK発現量、Y：リン酸化PI3K発現量/総タンパク量によるグリッド解析(比較例17)

【図25】X：リン酸化AKT発現量/リン酸化ERK発現量、Y：リン酸化AKT発現量/総タンパク量によるグリッド解析(比較例18)

【図26】X：PI3K活性/MEK活性、Y：MEK活性/総タンパク量によるグリッド解析

【図27】X：PI3K発現量/MEK発現量、Y：MEK発現量/総タンパク量によるグリッド解析(比較例19)

【図28】X：リン酸化PI3K発現量/リン酸化MEK発現量、Y：リン酸化MEK発現量/総タンパク量によるグリッド解析(比較例20)

10

【図29】X：リン酸化AKT発現量/リン酸化ERK発現量、Y：リン酸化ERK発現量/総タンパク量によるグリッド解析(比較例21)

【図30】MEK活性測定におけるHPLC法との相関性

【図31】PI3K活性測定におけるHPLC法との相関性

【図32】培養細胞から作製した担癌マウスより摘出した腫瘍中のキナーゼ活性比(PI3K活性/MEK活性)

【図33】MDA-MB-231から作製された担癌マウスを用いた薬剤投与による腫瘍成長抑制

【図34】HCC70から作製された担癌マウスを用いた薬剤投与による腫瘍成長抑制

【図35】SUM185PEから作製された担癌マウスを用いた薬剤投与による腫瘍成長抑制

20

【発明を実施するための形態】

【0028】

悪性腫瘍は、遺伝子変異によって自律的で制御されない増殖を行うようになった細胞集団(腫瘍、良性腫瘍と悪性腫瘍)のなかで周囲の組織に浸潤し、または転移を起こす腫瘍であり、悪性腫瘍(Malignant tumor)の用語は病理学において

- 1) 癌腫(Carcinoma)：上皮組織由来の悪性腫瘍
- 2) 肉腫(Sarcoma)：非上皮組織由来の悪性腫瘍
- 3) その他：白血病など

に分類され、本願において「癌細胞」とは癌腫の細胞を意味する。特に限定しないが、頭頸部癌(上顎癌、(上、中、下)咽頭癌、喉頭癌、舌癌、甲状腺癌)、胸部癌(乳癌、肺癌(非小細胞肺癌、小細胞肺癌))、消化器癌(食道癌、胃癌、十二指腸癌、大腸癌(結腸癌、直腸癌)、肝癌(肝細胞癌、胆管細胞癌)、胆嚢癌、胆管癌、膵癌、肛門癌、泌尿器の癌(腎癌、尿管癌、膀胱癌、前立腺癌、陰茎癌、精巣(睾丸)癌)、生殖器癌(子宮癌(子宮頸癌、子宮体癌)、卵巣癌、外陰癌、陰癌)、皮膚癌(基底細胞癌、有棘細胞癌)などの癌細胞がこれにあたる。

30

【0029】

「阻害剤感受性」とは、特に限定しないが、細胞が阻害剤により増殖阻害を起こすことを言う。一例としては、実際の臨床の抗がん剤治療の現場で、HER2陽性癌と認定された癌が抗HER2モノクローナル抗体であるトラスツズマブで増殖阻害を起こし、良好なpCRを示す場合、「阻害剤感受性」とであると定義できる。また、実際の臨床の抗がん剤治療の現場で、ルミナル型(ER・PgR陽性)癌と認定された癌が、抗エストロゲン薬であるタモキシフェンで増殖阻害を起こし、良好なpCRを示す場合、「阻害剤感受性」とであると定義できる。

40

「阻害剤非感受性」とは、特に限定しないが細胞が阻害剤により増殖阻害を起こさないことを言う。一例としては、実際の臨床の抗がん剤治療の現場で、HER2陰性癌と認定された癌が抗HER2モノクローナル抗体であるトラスツズマブで増殖阻害を起こさず、pCRを改善しない場合、「阻害剤非感受性」とであると定義できる。また、実際の臨床の抗がん剤治療の現場で、非ルミナル型(ER・PgR陰性)癌と認定された癌が、抗エストロゲン薬であるタモキシフェンで増殖阻害を起こさず、pCRを改善しない場合、「阻

50

害剤非感受性」であると定義できる。

あるいは、「阻害剤非感受性」とは実施例で用いた癌細胞株がトリプルネガティブ乳癌であると規定されるのと同様の条件下で、阻害剤添加条件下で細胞増殖阻害を起こさないことを「阻害剤非感受性」と定義してもよい。

さらには、細胞が、阻害剤濃度100 nM、1 μM、又は10 μMにおいて、12.5%、25%又は50%以上の増殖阻害率を示すことを「阻害剤感受性」と定義してもよい。逆に、細胞が、阻害剤濃度100 nM、1 μM、又は10 μMにおいて、12.5%、25%又は50%未満の増殖阻害率を示すことを「阻害剤非感受性」と定義してよい。

より好ましくは薬剤濃度100 nMにおける12.5%以上の増殖阻害率、薬剤濃度1 μMにおける25%以上の増殖阻害率、あるいは薬剤濃度10 μMにおける50%以上の増殖阻害率を示すことを「阻害剤感受性」と定義してもよく；逆に薬剤濃度100 nMにおける12.5%未満の増殖阻害率、薬剤濃度1 μMにおける25%未満の増殖阻害率、あるいは薬剤濃度10 μMにおける50%未満の増殖阻害率を示すことを「阻害剤非感受性」と定義してもよい。

【0030】

「PI3KおよびMEKの酵素活性」とは各々のキナーゼがその標的を「リン酸化」する活性をいう。該活性は、その「リン酸化」のリン酸の供給源であるATPをADPとリン酸に分解する活性と同義である。

【0031】

「PI3K阻害剤またはMEK阻害剤の効果予測」とは、該阻害剤が癌細胞の増殖を抑制する効果を予測すること意味する。好ましくは、生体内において該阻害剤が、抗癌剤として有効に機能する効果を予測すること意味する。

【0032】

「組織試料」とはヒト又は非ヒト動物の単離された組織をいう。「組織試料」は単離後、凍結保存などされていてもよい。

【0033】

「生検」とは診断の際に、顕微鏡などで観察するため病理組織の一部をメスや針などで採取することを意味する。好ましくは、PI3K阻害剤及びMEK阻害剤が投与される前に行われることが望ましい。乳がんの場合、患者の乳房より、「切除生検」（組織のしこり全摘出）；「切開生検」（一部を摘出）；「コア生検」（太い針で組織の一部を摘出）；あるいは「細針穿刺吸引(FNA)生検」（細い針で組織あるいは体液を摘出）ことにより採取される。

【0034】

「キット」中の「抗PI3K抗体」「抗MEK抗体」は液体の状態が存在してもよく、乾燥して固体の状態であってもよい。さらにビーズやプレートを含む固層に直接結合していてもよく；Protein A、G、Lやその融合たんぱく質或いは「抗PI3K抗体」及び「抗MEK抗体」を認識する抗体（例えば、「抗PI3K抗体」や「抗MEK抗体」がマウスIgG抗体であれば、マウスIgGを認識する抗体）を介して間接的に固定されていてもよい。

「キット」中、各「測定試薬」は試薬成分が溶解している溶液の状態が存在してもよく、乾燥した固体の状態であってもよい。「測定試薬」が固体の状態の場合、「キット」には「測定試薬」を溶かすための「溶媒」を含んでいてもよい。

【0035】

「抗PI3K抗体」とは、天然の活性を有するPI3Kを特異的に認識結合する抗体を指す。結合により、PI3Kの活性を阻害しないことが好ましい。PI3KのクラスI（IA・IB）、クラスIIおよびクラスIIIのPI3Kの各々サブユニットを認識する抗体であってもよく、それら特異的抗体の組み合わせであってもよい。クラスIAのp110サブユニットを認識する抗体が望ましい。

「抗MEK抗体」とは、天然の活性を有するMEKを特異的に認識結合する抗体を指す。MEK1～7を認識する抗体であってもよく、それら特異的抗体の組み合わせであっても

10

20

30

40

50

よい。ERK1/2の活性に關与するMEK1及びMEK2を特異的に認識する抗体、あるいはMEK1を特異的に認識する抗体とMEK2を特異的に認識する抗体の組み合わせであってもよい。

「抗体」は完全長(IgG、IgA、IgM、IgD、IgE)イムノグロブリンであってもよく、その抗原結合認識領域を含む断片(いわゆる断片抗体(Fab、Fab'、F(ab')₂)など)であってもよい。また「抗体」はヒト、マウス、ラット、ヤギ、ウマ、ラクダなど哺乳動物由来、魚類(サメを含む)や鳥類(ニワトリ)由来のものであってよい。

【0036】

「参照標準」とは、PI3K阻害剤およびMEK阻害剤の両方に非感受性である、又はPI3K阻害剤およびMEK阻害剤の両方に感受性である細胞；あるいは該細胞を含む組織を指す。

「参照標準のPI3K活性/MEK活性比」とは一検体由来の細胞組織から算出される「PI3K活性/MEK活性比」であっても、複数の患者あるいは健常者由来の組織細胞から算出される「PI3K活性/MEK活性比」であってもかまわない。あるいは1種又は複数種の培養細胞から算出される「PI3K活性/MEK活性比」であってもよい。乳がんの場合は、がんを発症していない反対の乳房より摘出した細胞組織から算出される「PI3K活性/MEK活性比」であってもよい。

【0037】

「患者」は哺乳動物であってもよく、「ヒト」又は「非ヒト哺乳動物」であってもよい。

【実施例】

【0038】

以下の実施例および比較例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0039】

<実施例1>

培養細胞を用いた細胞増殖試験によるMEK阻害剤及び感受性PI3K阻害剤感受性株の分類

1. 方法

培養細胞を種々の濃度のMEK阻害剤、及びPI3K阻害剤で処置し、細胞増殖阻害率を算出することでMEK及びPI3K感受性株の分類を行った。培養方法、分析方法を以下の通りである。

【0040】

株化細胞及び細胞培養

本研究に使用した13種類の細胞、HCC38(BL1)、MDA-MB-231(MSL)、DU4475(IM)、HCC1187(IM)、HCC1143(BL1)、HCC1395(LAR)、HCC1937(BL1)、MDA-MB-453(LAR)、HCC70(BL2)、HS578T(MSL)、MDA-MB-157(MSL)、MDA-MB-468(BL1)はATCC(American Type Culture Collection)、SUM185PE(LAR)はASTERAND BIO SCIENCEから入手した。いずれもトリプルネガティブ乳癌(TNBC)に属し、既存の分類法で6種類(BL1、BL2、M、MSL、IM、LAR)のいずれに属するかは公知である。

全ての細胞は、入手先指定の培地中で培養し、2mMのL-グルタミン、10%のウシ胎児血清(FBS)を補った。

【0041】

薬物感受性アッセイ法(細胞増殖試験)

各細胞を96ウェル・タイタープレートに 1×10^4 細胞/ウェルで播種し、MEK阻害剤であるトラメチニブ(MedichemExpress; 0.08, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μ M)およびPI3K阻害剤であ

10

20

30

40

50

るウォルトマンニン（和光純薬；0.08, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μM ）の種々の濃度でDemethyl Sulfoxide [DMSO]（和光純薬）に溶解し処置した。また、阻害剤72時間後に、細胞増殖に対する効果をスルホローダミンBアッセイ法（SIGMA-ALDRICH社製）によって検査し、50 μL のスルホローダミンB溶液をそれぞれのウェルに添加して、細胞を室温において1時間染色した。代謝的に生存可能な細胞の染色の程度を565 nmの波長でマイクロタイタープレートを使用して吸光度をモニターした。細胞増殖阻害率は、トラメチニブおよびウォルトマンニンで処置されていない細胞（DMSOによる処置）の吸光度を対象として100%と定義することで算出した。

【0042】

10

2A. 結果

図1Aに結果を示す。各種細胞株をウォルトマンニン感受性株（以下PA）、トラメチニブ感受性株（以下MA）、ウォルトマンニン及びトラメチニブ耐性株（以下R）、その他（以下S）の4種類に分類した。分類はまず各種薬剤濃度1 μM の阻害率を算出し、X軸をトラメチニブによる阻害率（%）、Y軸をウォルトマンニンによる阻害率（%）をグラフにプロットした。25%増殖阻害率を薬剤阻害効果の指標とし、グリッド解析を行うことで4種類に分類した。

この方法によって、HCC38（BL1）、MDA-MB-231（MSL）、DU4475（IM）、HCC1187（IM）、HCC1143（BL1）、をMA、HCC1395（LAR）、HCC1937（BL1）、HS578T（MSL）、MDA-MB-157（MSL）をR、MDA-MB-453（LAR）、HCC70（BL2）をS、MDA-MB-468（BL1）、SUM185PE（LAR）をPAと分類できた。

20

この結果は既存の分類方法からは予想もつかない結果であった。

【0043】

2B. 結果

図1Bに結果を示す。各種細胞株をウォルトマンニン感受性株（以下PA）、トラメチニブ感受性株（以下MA）、ウォルトマンニン及びトラメチニブ耐性株（以下R）、その他（以下S）の4種類に分類した。分類はまず各種薬剤濃度100 nMの阻害率を算出し、X軸をトラメチニブによる阻害率（%）、Y軸をウォルトマンニンによる阻害率（%）をグラフにプロットした。12.5%増殖阻害率を薬剤阻害効果の指標とし、グリッド解析を行うことで4種類に分類した。

30

この方法によって、HCC38（BL1）、MDA-MB-231（MSL）、DU4475（IM）、HCC1187（IM）、HCC1143（BL1）、をMA、HCC1395（LAR）、HCC1937（BL1）、HS578T（MSL）、MDA-MB-157（MSL）をR、MDA-MB-453（LAR）、HCC70（BL2）をS、MDA-MB-468（BL1）、SUM185PE（LAR）をPAと分類できた。

この結果は既存の分類方法からは予想もつかない結果であった。

【0044】

40

2C. 結果

図1Cに結果を示す。各種細胞株をウォルトマンニン感受性株（以下PA）、トラメチニブ感受性株（以下MA）、ウォルトマンニン及びトラメチニブ耐性株（以下R）、その他（以下S）の4種類に分類した。分類はまず各種薬剤濃度10 μM の阻害率を算出し、X軸をトラメチニブによる阻害率（%）、Y軸をウォルトマンニンによる阻害率（%）をグラフにプロットした。50%増殖阻害率を薬剤阻害効果の指標とし、グリッド解析を行うことで4種類に分類した。

この方法によって、HCC38（BL1）、MDA-MB-231（MSL）、DU4475（IM）、HCC1187（IM）、HCC1143（BL1）、をMA、HCC1395（LAR）、HCC1937（BL1）、HS578T（MSL）、MDA-M

50

B - 1 5 7 (M S L) を R、 M D A - M B - 4 5 3 (L A R)、 H C C 7 0 (B L 2) を S、 M D A - M B - 4 6 8 (B L 1)、 S U M 1 8 5 P E (L A R) を P A と分類できた。

この結果は既存の分類方法からは予想もつかない結果であった。

【 0 0 4 5 】

以上により、上記グリット解析は、薬剤濃度や増殖阻害率の数値限定を伴わなくても極めて再現性よく、各種細胞株の薬剤感受性・薬剤非感受性を分類することが可能である。

【 0 0 4 6 】

< 実施例 2 >

培養細胞抽出液中のキナーゼ活性測定

10

1. 方法

培養細胞から細胞可溶物を抽出し、各種キナーゼに対する特異抗体を用いて目的キナーゼを補足した後高速液体クロマトグラフィー [H P L C] を用いて測定を行った。測定サンプルの調製方法、測定方法は以下に示す。

【 0 0 4 7 】

キナーゼ解析のための細胞可溶物の調製

キナーゼ解析に供される株化細胞の可溶化液は、以下の通りに調製した。細胞を 1 0 % の F B S (ウシ胎児血清) を含む所定の培地中で培養した。細胞数 1×10^7 程度まで培養した後、細胞を収集して、P B S で一度洗浄した。次いで、細胞を 2 4 G の針で 2 0 回注射することによって溶解緩衝液 (0 . 1 % の N P - 4 0、5 0 m M トリス - H C l [p H 7 . 4]、1 5 0 m M N a C l) で溶解した。不溶性物質を除去するために 5 分間の 1 5 0 0 0 r p m の遠心分離を行い細胞可溶物とした。

20

【 0 0 4 8 】

細胞可溶物中の M E K の捕捉と活性測定

M E K 活性測定は、H P L C を使用して行なった。具体的には、キナーゼ反応により生じる生成物である A D P の量を測定し、その濃度をキナーゼ活性に換算した。細胞可溶物は、前項に記載したとおりに調製した。M E K 分子は、4 μ g の対応する抗体 (抗 M E K 1 / M E K 2 ; S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y) 及び 1 0 0 μ L のプロテイン G ビーズ (L i f e t e c h n o l o g i e s) で細胞可溶化液 2 0 0 μ L から 4 において 2 時間選択的に沈殿させた。洗浄緩衝液 1 (0 . 1 % T X - 1 0 0、5 0 M m トリス - H C l [p H 7 . 4]、1 5 0 m M N a C l) で 2 回、その後洗浄緩衝液 2 (5 0 m M トリス - H C l [p H 7 . 4]、1 5 0 m M N a C l) で 2 回洗浄後、1 μ g のタンパク質基質 (u n a c t i v e - E R K ; S i g n a l c h e m)、2 m M アデノシン三リン酸 (A T P) (S i g m a)、7 0 m M のトリス - H C l (p H 8 . 5)、7 m M の塩化マグネシウムを含む 1 0 0 μ L の基質混合物をビーズに添加して、3 7 において 2 時間、連続振盪化でインキュベーションした。反応終了後、基質反応液を H P L C にアプライし、反応混合液中の A D P 量を測定し活性に換算した。なお、A D P 量は既知濃度の A D P を用い前もって作成した検量線を用いて算出した。また、1 ユニット (U) は、3 7 下 1 分間に発生する 1 p m o l の A D P を酵素量と規定した。

30

40

【 0 0 4 9 】

活性測定方法

測定条件を以下に示す。

A g i l e n t T e c h n o l o g i e s 1 2 2 0 I n f i n i t y L C、T o s o h T S K g e l O D S - 1 0 0 V 5 μ m 4 . 6 \times 1 5 0 m m、溶離液 A : A c e t o n i t r i l w i t h 0 . 1 % T r i f l u o r o a c e t i c a c i d (F l u k a)、溶離液 B : W a t e r w i t h 0 . 1 % T r i f l u o r o a c e t i c a c i d (F l u k a)、F l o w r a t e 0 . 5 m L / m i n、W a v e l e n g t h : 2 5 4 n m

【 0 0 5 0 】

50

PI3K 活性測定

PI3K 活性測定も MEK と同様に、HPLC を使用して行なった。細胞可溶化物は、MEK 活性測定と同様に調製した。PI3K 分子は、12 μ g の対応する抗体 (抗 PI3K 110 ; Santa Cruz Biotechnology) 及び 150 μ L のプロテイン G ビーズ (Life technologies) で細胞可溶化液 200 μ L から 4 において 2 時間選択的に沈殿させた。洗浄緩衝液 1 (0.1% TX-100、50 mM トリス - HCl [pH 7.4]、150 mM NaCl) で 2 回、その後洗浄緩衝液 2 (50 mM トリス - HCl [pH 7.4]、150 mM NaCl) で 2 回洗浄後、50 nM の基質 (L - a - Phosphatidylinositol sodium salt ; Sigma)、2 mM アデノシン三リン酸 (ATP) (Sigma)、70 mM のトリス - HCl (pH 7.5)、7 mM の塩化マグネシウムを含む 100 μ L の基質混合物をビーズに添加して、37 において 2 時間、連続振盪化でインキュベーションした。反応終了後、反応混合液を HPLC にアプライし、反応液中の ADP 量を測定し活性に換算した。なお、ADP 量は既知濃度の ADP を用い前もって作成した検量線を用いて算出した。また、1 ユニット (U) は、37 下 1 分間に発生する 1 pmol の ADP を酵素量と規定した。測定方法は前述と同様である。

10

【0051】

2. 結果

[表 1] に示すように各種細胞株で異なるキナーゼ活性値を示した。

【0052】

20

【表 1】

	MEK 活性値[U]	PI3K 活性値[U]
MDA-MB-453	25.6	7.03
HCC1937	8.65	2.09
HCC1187	12.85	0.81
MDA-MB-468	3.87	8.90
HS578T	3.53	5.08
MDA-MB-157	2.84	5.50
HCC70	2.53	3.24
MDA-MB-231	13.79	1.49
SUM185PE	12.54	32.27
HCC1395	40.76	3.75
HCC38	23.83	0.24
HCC1143	18.62	1.57
DU4475	28.60	1.39

30

【0053】

< 実施例 3 >

ウェスタンブロットによる培養細胞抽出液中のキナーゼ発現量及びリン酸化量の測定

40

1. 方法

前述の方法で得た細胞抽出液からウェスタンブロット法にて発現量を測定した。また、細胞数をノーマライズすべく分光光度計にて 280 nm 吸光度の測定を行った。方法は以下に示す。

【0054】

ウェスタンブロットによる MEK と PI3K の発現量、リン酸化発現量及びリン酸化 ERK 発現量、リン酸化 AKT 発現量の測定

発現量及びリン酸化量解析に供される株化細胞の可溶化液も、活性測定と同様に調製した。ウェスタンブロット法のために、株化細胞の可溶化液をドデシル硫酸ナトリウム ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ニトロセルロース膜へ転写した。膜をポリクロー

50

ナル抗MEK1/2抗体(Cell signaling ; 1:1000)、ポリクローナル抗Phospho-MEK1/2抗体(Ser217/221) (Cell signaling ; 1:1000)、ポリクローナル抗PI3K p110 抗体(Cell signaling ; 1:1000)、ポリクローナル抗Phospho-PI3K p85 (Tyr458) / p55 (Tyr199) 抗体(Cell signaling ; 1:1000)、ポリクローナル抗Phospho-ERK1/2抗体(Thr202 / Tyr204) (Cell signaling ; 1:1000)、ポリクローナル抗Phospho-AKT抗体(Thr308) (Cell signaling ; 1:1000)と共に室温で1時間(または4で一晚)インキュベートし、続いて西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗体とインキュベーションした。結果は、化学発光検出系で増強して視覚化した。リコンビナントMEK及びPI3Kを用いて検量線を作成し、MEK、リン酸化MEK、及びPI3K、リン酸化PI3K量を算出した。

10

【0055】

2. 結果

[表2]に示すように各種細胞株で異なるキナーゼ発現量及びリン酸化量を示した。

【表2】

	MEK発現量[ng]	PI3K発現量[ng]	リン酸化MEK発現量[U]	リン酸化PI3K発現量[U]	リン酸化ERK発現量[U]	リン酸化AKT発現量[U]
MDA-MB-453	9.71	11.01	2.55	32.47	1.55	6.47
HCC1937	0.47	3.19	1.59	6.10	1.46	4.26
HCC1187	2.21	5.97	1.84	57.36	1.49	5.44
MDA-MB-468	14.02	8.45	11.52	181.39	2.04	5.28
HS578T	2.61	2.05	2.30	78.03	1.05	4.51
MDA-MB-157	12.11	2.27	2.07	545.10	1.27	4.43
HCC70	2.53	2.66	2.71	5.74	0.95	4.87
MDA-MB-231	1.01	4.66	12.68	66.2	0.93	5.06
SUM185PE	3.11	8.26	2.60	118.6	1.02	6.05
HCC1395	2.90	3.70	3.80	181.4	1.20	18.20
HCC38	6.80	8.80	0.70	99.3	1.90	3.80
HCC1143	8.90	19.20	0.80	20.00	1.00	1.40
DU4475	10.30	2.30	15.80	78.00	6.20	4.50

20

【0056】

<実施例4>

細胞可溶化液中のLDH活性及びA280の測定

1. 方法

前述の方法で得た細胞抽出液を、試薬としてN-アッセイLDH(ニットーボーメディアカル)、また測定機器として日立7180形自動分析装置を用い、試料4μLと第一試薬160μLとを37、5分間混合した後、得られる液に、第二試薬40μLを加え同温度で5分間、発色反応させた。発色反応開始後の1分間当りの吸光度変化を主波長340nm、副波長405nmで測定した。濃度既知の標準液を用い吸光度変化量からLDH活性[U]を算出した。

また、同様の可溶化液をPharmacia Biotech Ultrasp3000分光光度計にて280nm吸光度を測定し、得られた吸光度をABS1.0=1.0mg/mLで換算した。

以上の2種の値を細胞数のノーマライズに用いた。

【0057】

2. 結果

[表3]に示すように各種細胞株のLDH活性及び総タンパク量を得た。

30

40

【表 3】

	LDH活性値[U]	総タンパク量[mg/mL]
MDA-MB-453	5340	6.72
HCC1937	660	3.56
HCC1187	2780	7.68
MDA-MB-468	5820	8.02
HS578T	6740	6.52
MDA-MB-157	3840	6.06
HCC70	1300	4.72
MDA-MB-231	11640	8.56
SUM185PE	4140	7.74
HCC1395	10435	14.16
HCC38	23125	14.38
HCC1143	18385	18.80
DU4475	8255	13.80

10

【0058】

<実施例 5>

MEK阻害剤感受性株及びPI3K阻害剤感受性株の判定パラメーターの構築

20

1. 方法

これまで(実施例2~4)に算出したプロテインキナーゼに関する8つの値、すなわちI:MEK活性、II:PI3K活性、III:MEK発現量、IV:MEKリン酸化量、V:PI3K発現量、VI:PI3Kリン酸化量、VII:LDH活性、VIII:総タンパク量を用い、上記で分類した細胞株の薬剤感受性を予測するパラメーターの構築を行なった。

解析にあたっては、HCC38(BL1)を細胞株1、MDA-MB-231(MSL)を細胞株2、DU4475(IM)を細胞株3、HCC1187(IM)を細胞株4、HCC1143(BL1)を細胞株5、HCC1395(LAR)を細胞株6、HCC1937(BL1)を細胞株7、HS578T(MSL)を細胞株8、MDA-MB-157(MSL)を細胞株9、MDA-MB-453(LAR)を細胞株10、HCC70(BL2)を細胞株11、MDA-MB-468(BL1)を細胞株12、SUM185PE(LAR)を細胞株13と定義した。

30

【0059】

2. 結果

鋭意検討した結果、「PI3K活性/MEK活性」というパラメーターを用いることにより、2種の阻害剤感受性株を高確率で予測することが可能になった。具体的には、「PI3K活性/MEK活性」が高値、すなわちPI3K活性がMEK活性と比較して非常に高い領域に、PI3K阻害剤感受性株(PA)が位置している。上記とは逆にPI3K活性/MEK活性が低値、すなわちMEK活性がPI3K活性と比較して非常に高い領域に、MEK阻害剤感受性株(MA)が位置している(図2)。

40

これに対して、類似したパラメーターである、「PI3K発現量/MEK発現量」(比較例1:図3)、「リン酸化PI3K発現量/リン酸化MEK発現量」(比較例2:図4)や反応生成物である「リン酸化AKT発現量/リン酸化ERK発現量」(比較例3:図5)を用いた場合はこのような傾向は確認できず、予測をすることは出来なかった。本結果より、発現量やリン酸化量ではなく、活性を測定することの有効性が示された。

【0060】

<実施例 6>

グリッド解析によるMEK阻害剤感受性株及びPI3K阻害剤感受性株の判定

1. 方法

50

実施例 5 と同様に 8 つの値、すなわち I : MEK 活性、II : PI3K 活性、III : MEK 発現量、IV : MEK リン酸化量、V : PI3K 発現量、VI : PI3K リン酸化量、VII : LDH 活性、VIII : 総タンパク量を用いて算出したパラメーターを 2 軸のグラフ上にプロットし、カットオフ条件を含めた検証を行なった。また、グラフ上にプロットするにあたっては、MA を、PA を、その他の細胞株を でプロットを行なった。

グリッド解析の評価項目として、感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率、正確度の 5 項目を算出した。

感度は本検証においては、「感受性と判断されるべきものを正しく感受性と判定する確率」と定義される。1 例を挙げると、解析に用いる全細胞株中に MEK 阻害剤感受性株 (MA) が 2 個含まれており、解析の結果、MEK 阻害剤感受性と判定した領域にその感受性細胞株のうち 1 個がプロットされた場合、感度は、 $1 / 2 = 50\%$ となる。

10

特異度は本検証においては、「非感受性と判断されるべきものを正しく非感受性と判定する確率」と定義される。1 例を挙げると、解析に用いる全細胞株中に MEK 阻害剤非感受性株が 8 個含まれており、解析の結果、MEK 阻害剤非感受性と判定した領域に非感受性細胞株が 4 個プロットされた場合、特異度は、 $4 / 8 = 50\%$ となる。

陽性的中率は本検証においては、「感受性と判断された場合に、真に感受性である確率」と定義される。1 例を挙げると、解析の結果 MEK 阻害剤感受性と判定した領域に細胞株が 2 個プロットされ、その細胞株のうち 1 個が MEK 阻害剤感受性である場合、陽性的中率は、 $1 / 2 = 50\%$ となる。

20

陰性的中率は本検証においては、「非感受性と判断された場合に、真に非感受性である確率」と定義される。1 例を挙げると、解析の結果 MEK 阻害剤非感受性と判定した領域に細胞株が 6 個プロットされ、その細胞株のうち 5 個が MEK 阻害剤非感受性である場合、陽性的中率は、 $5 / 6 = 83\%$ となる。

正確度は本検証においては、「真の感受性株と真の非感受性株が全体に占める割合」と定義される。1 例を挙げると、解析に用いる全細胞株数が 10 個であり、その内 MEK 阻害剤感受性株が 2 個、MEK 阻害剤非感受性株が 8 個であるとする。解析の結果、MEK 阻害剤感受性株の内 1 個を感受性 (真陽性)、残り 1 個を非感受性 (偽陰性) と判断し、MEK 阻害剤非感受性株の内 2 個を感受性 (偽陽性)、残り 6 個 (真陰性) を非感受性と判断した。この場合、正確度は、 $(1 + 6) / (1 + 2 + 1 + 6) = 70\%$ となる。

30

【0061】

2. 結果

種々検討をした結果、数種のパラメーターの組み合わせにてグリッド解析を行った (表 4 ~ 9)。そのうち、細胞株の薬剤感受性を予測が可能となった (パラメーターは以下の 6 通りである図 6、10、14、18、22、26)。

1) X : PI3K 活性 / LDH 活性 Y : MEK 活性 / LDH 活性 (図 6) 2) X : PI3K 活性 / MEK 活性 Y : PI3K 活性 / LDH 活性 (図 10)

3) X : PI3K 活性 / MEK 活性 Y : MEK 活性 / LDH 活性 (図 14)

4) X : PI3K 活性 / 総タンパク量 Y : MEK 活性 / 総タンパク量 (図 18)

5) X : PI3K 活性 / MEK 活性 Y : PI3K 活性 / 総タンパク量 (図 22)

40

6) X : PI3K 活性 / MEK 活性 Y : MEK 活性 / 総タンパク量 (図 26)

対して活性値の代わりに発現量 (図 7、11、15、19、23、27)、リン酸化量 (図 8、12、16、20、24、28) もしくは基質のリン酸化量 (図 9、13、17、21、25、29) を用いた場合には感受性予測が不可能であった (比較例 4 ~ 21)。

【0062】

1) パラメーター比較

【表4】

		1)によるグリッド解析			
		活性	発現量	リン酸化量	基質リン酸化量
MA	感度	40%	0%	40%	20%
	特異度	88%	75%	100%	100%
	陽性的中率	67%	0%	100%	100%
	陰性的中率	80%	45%	73%	67%
	正確度	77%	38%	77%	69%
PA	感度	100%	0%	0%	0%
	特異度	91%	82%	82%	100%
	陽性的中率	67%	0%	0%	0%
	陰性的中率	100%	82%	82%	83%
	正確度	92%	69%	69%	77%

10

【0063】

2) パラメーター比較

【表5】

		2)によるグリッド解析			
		活性	発現量	リン酸化量	基質リン酸化量
MA	感度	100%	60%	60%	100%
	特異度	75%	50%	63%	63%
	陽性的中率	71%	43%	38%	63%
	陰性的中率	100%	67%	60%	100%
	正確度	85%	54%	46%	77%
PA	感度	100%	0%	0%	0%
	特異度	100%	82%	73%	73%
	陽性的中率	67%	0%	0%	0%
	陰性的中率	91%	82%	80%	80%
	正確度	92%	69%	62%	77%

20

30

【0064】

3) パラメーター比較

【表6】

		3)によるグリッド解析			
		活性	発現量	リン酸化量	基質リン酸化量
MA	感度	40%	0%	20%	20%
	特異度	63%	75%	100%	100%
	陽性的中率	100%	0%	100%	100%
	陰性的中率	73%	82%	67%	64%
	正確度	77%	69%	54%	62%
PA	感度	100%	50%	0%	100%
	特異度	64%	45%	45%	55%
	陽性的中率	33%	14%	0%	33%
	陰性的中率	100%	83%	71%	100%
	正確度	54%	46%	38%	69%

40

【0065】

4) パラメーター比較

【表 7】

		4)によるグリッド解析			
		活性	発現量	リン酸化量	基質リン酸化量
MA	感度	40%	20%	40%	40%
	特異度	88%	88%	88%	88%
	陽性的中率	67%	50%	40%	67%
	陰性的中率	80%	64%	70%	90%
	正確度	92%	62%	69%	85%
PA	感度	100%	50%	0%	0%
	特異度	100%	88%	73%	73%
	陽性的中率	100%	50%	0%	0%
	陰性的中率	100%	91%	80%	80%
	正確度	100%	85%	62%	62%

10

【 0 0 6 6 】

5) パラメーター比較

【表 8】

		5)によるグリッド解析			
		活性	発現量	リン酸化量	基質リン酸化量
MA	感度	100%	40%	80%	100%
	特異度	63%	50%	50%	75%
	陽性的中率	63%	33%	50%	71%
	陰性的中率	100%	57%	80%	100%
	正確度	77%	46%	62%	77%
PA	感度	100%	50%	0%	0%
	特異度	91%	91%	73%	75%
	陽性的中率	67%	50%	0%	0%
	陰性的中率	100%	91%	80%	82%
	正確度	92%	85%	62%	69%

20

【 0 0 6 7 】

6) パラメーター比較

【表 9】

		6)によるグリッド解析			
		活性	発現量	リン酸化量	基質リン酸化量
MA	感度	40%	20%	20%	40%
	特異度	100%	75%	88%	100%
	陽性的中率	100%	33%	40%	100%
	陰性的中率	73%	60%	64%	73%
	正確度	77%	54%	62%	77%
PA	感度	100%	50%	0%	50%
	特異度	38%	36%	45%	45%
	陽性的中率	100%	13%	0%	14%
	陰性的中率	73%	80%	71%	83%
	正確度	77%	38%	38%	46%

40

【 0 0 6 8 】

< 実施例 7 >

化学発光法を測定原理とするキナーゼ活性測定キットによる培養細胞抽出液中のキナーゼ活性測定

1. 方法

対照法 (HPLC法: 実施例 2) との相関性を確認した。

試料

50

乳癌細胞株16種類を用いた。具体的には、HCC38、MDA-MB-231、DU4475、HCC1187、HCC1143、HCC1395、HCC1937、HS578T、MDA-MB-157、MDA-MB-453、HCC70、MDA-MB-468、SUM185PE、BT20、BT549、HCC1806の16種類である。

第一試薬

Tris-HCl pH7.5 (SIGMA)	100 mM	
MgCl ₂ (和光純薬)	10 mM	
EDTA・2Na (同仁化学)	5 mM	
NaF (和光純薬) (脱リン酸化酵素阻害剤)	50 mM	
Na ₃ VO ₄ (和光純薬) (脱リン酸化酵素阻害剤)	1 mM	10
Protease inhibitor mixture (ナカライテスク)	1 %	
NP-40 (ナカライテスク)	0.1 %	

第二試薬

1) MEK測定用		
Dynabeads ProteinG (Life technologies)	15 mg/mL	
anti-MEK1 antibody (IgG) (Santa Cruz Biotechnology)	20 µg/mL	20
anti-MEK2 antibody (IgG) (Santa Cruz Biotechnology)	20 µg/mL	
2) PI3K測定用		
Dynabeads ProteinG (Life technologies)	22.5 mg/mL	
anti-PI3K 110 antibody (IgG) (Santa Cruz Biotechnology)	60 µg/mL	

第三試薬

1) MEK測定用		
Tris-HCl pH7.5 (SIGMA)	100 mM	
NaCl (和光純薬)	300 mM	30
unactive-ERK (Signalchem)	100 µg/mL	
アデノシン三リン酸 (ATP、SIGMA)	10 mM	
2) PI3K測定用		
Tris-HCl pH7.5 (SIGMA)	100 mM	
NaCl (和光純薬)	300 mM	
L-a-Phosphatidylinositol sodium salt (Signalchem)	0.5 mM	
アデノシン三リン酸 (ATP、SIGMA)	10 mM	

第四試薬

Tris-HCl pH8.5 (SIGMA)	100 mM	40
硫酸マグネシウム7水和物 (和光純薬)	10 mM	
D-Glucose (和光純薬)	40 mM	
ADP-Hexokinase (旭化成)	20 KU/L	
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (ロシュ・ダイアグノスティクス)	20 KU/L	
Diphorase (旭化成)	5 KU/L	
NADP (ロシュ・ダイアグノスティクス)	3 mM	

第五試薬

Sodium Carbonate pH9.8 (和光純薬)	100 mM	
Luminol (和光純薬)	1 mM	50

P - i o d p h e n o l (和光純薬) (増発光剤)	0 . 3 m M
P e r o x i d a s e (東洋紡)	2 0 K U / L

第六試薬

T r i s - H C l p H 7 . 5 (S I G M A)	1 0 0 m M
N a C l (和光純薬)	3 0 0 m M
ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (ナカライテスク)	0 . 0 5 %

【0069】

キナーゼ活性のための細胞可溶物の調製

キナーゼ解析に供される株化細胞の可溶化液は、以下の通りに調製した。細胞を10%のFBS(ウシ胎児血清)を含む細胞毎に適した培地で培養した。細胞数 1×10^7 程度まで培養した後、細胞を収集して、PBSで一度洗浄した。次いで、細胞に第一試薬を0.5mL添加し、ポルテックスミキサーで攪拌することによって溶解した。不溶性物質を除去するために5分間の15000rpmの遠心分離を行い細胞可溶物とした。

【0070】

細胞可溶物中のMEKの捕捉とキナーゼ反応

細胞可溶化物0.2mLに対してMEK測定用第二試薬を0.2mL添加し、4において2時間攪拌することにより、MEK分子を選択的に沈殿させた。反応終了後、上清を除去した後、第六試薬を0.5mL加えてMEK捕捉磁性粒子を懸濁することによる洗浄操作を3回行なった。洗浄後、MEK測定用第三試薬を0.5mL加え、37において2時間、振盪させながらキナーゼ反応を行なった。反応終了後、反応液を回収し、HPLC法及び化学発光法による活性測定を行なった。HPLC法による活性測定方法は実施例2と同様である。

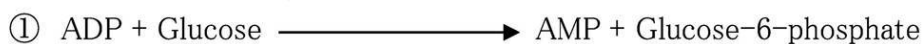
【0071】

化学発光法を用いたMEK活性測定

MEK活性測定はキナーゼ反応により生じるADPを間接的に測定することにより行なった。具体的には、公知の酵素反応を組み合わせることにより行なった。(下図参照)

【化3】

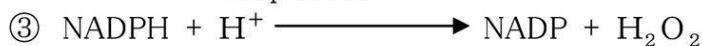
ADP 依存性 Hexokinase



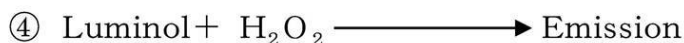
G6PDH



Diaphorase



Peroxidase



【0072】

まず上記3段階の酵素反応を行なうことにより、ADPを過酸化水素に変換した。具体的な酵素反応は、1)ADP依存性Hexokinaseによる、ADPとGlucoseからのGlucose-6-phosphateの生成、2)Glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PDH)による、Glucose-6-phosphateとNADPからのNADPHの生成、3)Diaphoraseによる、NADPHと水素イオンからの過酸化水素の生成、である。さらに、4)過酸化水素をLuminol及びPeroxidaseと反応させることにより発光を生じさせ、検出装置で検出した。検出した化学発光強度に基づき、ADP濃度を介して、キナーゼ

10

20

30

40

50

活性に換算した。

具体的な測定プロトコールとしては、上記キナーゼ反応で得た反応液をミリQで4倍希釈したものを、96ウェルプレートに20 μ Lアプライし、そこに第四試薬を20 μ L添加し、37において10分間、振盪させながらインキュベーションし、ADPの量を依存した過酸化水素を発生させた。反応終了後、プレート測定に対応するルミノメーター(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)にプレートをセットし、各ウェルに第五試薬を30 μ L添加し、試薬添加により生じる化学発光強度を測定した。測定した化学発光強度に基づき、ADP濃度を介して、キナーゼ活性に換算した。

なお、ADP濃度は既知濃度のADPを用い前もって作成した検量線を用いて算出した。また、1ユニット(U)は、37下1分間に発生する1pmolのADPを酵素量と規定した。

10

【0073】

細胞可溶物中のPI3Kの捕捉とキナーゼ反応

MEKと同様に、細胞可溶化物0.2mLに対してPI3K測定用第二試薬を0.2mL添加し、4において2時間攪拌することにより、PI3K分子を選択的に沈殿させた。反応終了後、上清を除去した後、第六試薬を0.5mL加えてPI3K捕捉磁性粒子を懸濁することによる洗浄操作を3回行なった。洗浄後、PI3K測定用第三試薬を0.5mL加え、37において2時間、振盪させながらキナーゼ反応を行なった。反応終了後、反応液を回収し、HPLC法及び化学発光法による活性測定を行なった。HPLC法による活性測定方法は実施例2と同様である。

20

【0074】

化学発光法を用いたPI3K活性測定

PI3K活性測定もMEK活性測定と同様に、キナーゼ反応により生じるADPを間接的に測定することにより行なった。具体的には、公知の酵素反応を組み合わせることにより行なった。(下図参照)

【化4】

ADP依存性 Hexokinase

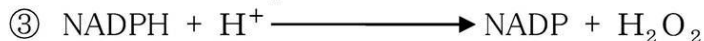


30

G6PDH



Diaphorase



Peroxidase



【0075】

40

まず上記3段階の酵素反応を行なうことにより、ADPを過酸化水素に変換した。具体的な酵素反応は、1)ADP依存性Hexokinaseによる、ADPとGlucoseからのGlucose-6-phosphateの生成、2)Glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PDH)による、Glucose-6-phosphateとNADPからのNADPHの生成、3)Diaphoraseによる、NADPHと水素イオンからの過酸化水素の生成、である。さらに、4)過酸化水素をLuminol及びPeroxidaseと反応させることにより発光を生じさせ、検出装置で検出した。検出した化学発光強度に基づき、ADP濃度を介して、キナーゼ活性に換算した。

【0076】

50

2. 結果

M E K 活性測定における H P L C 法との相関性を図 3 0 に示す。

H P L C 法を X、本法を Y として相関性を確認した。図 3 0 に示したように、 $Y = 1.2168X - 0.2884$ 、相関係数 0.896 と良好な結果が得られた。このことから本法はヒト乳癌細胞中の M E K 活性を正確に測定できているといえる。

同様に、P I 3 K 活性測定における H P L C 法との相関性を図 3 1 に示す。

H P L C 法を X、本法を Y として相関性を確認した。図 3 1 に示したように、 $Y = 0.9027X - 0.0337$ 、相関係数 0.943 と良好な結果が得られた。このことから本法はヒト乳癌細胞中の P I 3 K 活性を正確に測定できているといえる。

< 実施例 8 >

10

培養細胞から作製した担癌マウスより摘出した腫瘍中のキナーゼ活性測定

1. 方法

培養したトリプルネガティブ乳癌細胞株をヌードマウスの皮下に注入することで、担癌マウスを作製し、腫瘍組織として生着した後、所定の大きさで摘出した。摘出した腫瘍から目的キナーゼを含む可溶物を抽出し、各種キナーゼに対する特異抗体を用いて目的キナーゼを補足した後化学発光法を用いて測定を行った。測定サンプルの調製方法、測定方法は以下に示す。なお、測定方法及び試薬名称等に関しては、実施例 7「化学発光法を測定原理とするキナーゼ活性測定キットによる培養細胞抽出液中のキナーゼ活性測定」と同様である。

【 0 0 7 7 】

20

細胞懸濁液及び担癌マウスの作製

M A と分類された M D A - M B - 2 3 1、S と分類された H C C 7 0 及び P A と分類された S U M 1 8 5 P E 細胞株を前述の方法によって培養し、トリプシンで剥離後約 7×10^6 細胞 / m L になるように M a t r i g e l 基底膜マトリックス (コーニング社製) にて懸濁し細胞懸濁液を調製した。27ゲージのシリンジを用い、0.1 m L の細胞懸濁液を5週齢メスのヌードマウス (日本クレア社製) の皮下に注入することで担癌マウスを作製し、腫瘍体積を観測した。腫瘍体積は長径 \times (短径)² / 2 で算出した。

【 0 0 7 8 】

腫瘍の摘出

腫瘍体積が 300 mm^3 に達した段階で腫瘍を摘出した。解析にあたっては、M D A - M B - 2 3 1 を用いて作製した腫瘍を腫瘍 1、H C C 7 0 を用いて作製した腫瘍を腫瘍 2、S U M 1 8 5 P E を用いて作製した腫瘍を腫瘍 3 と定義した。

30

【 0 0 7 9 】

キナーゼ活性のための腫瘍可溶物の調製

キナーゼ解析に供される腫瘍の可溶液は、以下の通りに調製した。摘出した腫瘍の重量を測定し、腫瘍 1 g あたり 16 m L の第一試薬を添加し、氷冷下において乳棒及び乳鉢を用いてすり潰すことにより、腫瘍組織を破碎した。不溶性物質を除去するために5分間の 15000 rpm の遠心分離を行い腫瘍可溶物とした。

【 0 0 8 0 】

腫瘍可溶物中の M E K の捕捉とキナーゼ反応

40

化学発光法を用いた M E K 活性測定

腫瘍可溶物中の P I 3 K の捕捉とキナーゼ反応

化学発光法を用いた P I 3 K 活性測定

実施例 7「化学発光法を測定原理とするキナーゼ活性測定キットによる培養細胞抽出液中のキナーゼ活性測定」と同様である。

【 0 0 8 1 】

2. 結果

図 3 2 に、3 種類の細胞株由来の腫瘍活性測定結果を示す (個体数 $N = 3$)。M E K 阻害剤感受性株 (M A)、P I 3 K 阻害剤感受性株 (P A) 由来の腫瘍からサンプルを調製し「P I 3 K 活性 / M E K 活性」を算出した。この場合、例えば M A、P A いずれにも該

50

当しないHCC70細胞由来の腫瘍サンプルを参照標準とすれば、「PI3K活性/MEK活性」が参照標準より低い腫瘍についてはMEK阻害剤感受性であり、PI3K活性/MEK活性」が参照標準より高い腫瘍についてはPI3K阻害剤感受性であるという示唆を得ることが可能となる。表10に参照標準に対するMEK阻害剤感受性株(MA)またはPI3K阻害剤感受性株(PA)の「PI3K活性/MEK活性」のp値を示す。

【表10】

	MDA-MB-231	SUM185PE
HCC70	<0.05	<0.05

【0082】

<実施例9>

培養細胞から作製された担癌マウスを用いた薬剤投与による腫瘍成長抑制試験

1. 方法

培養したトリプルネガティブ乳癌細胞株をヌードマウスの皮下に注入することで、担癌マウスを作製し、腫瘍組織として生着した後、PI3K阻害剤、及びMEK阻害剤を投与し、腫瘍体積を測定することで抗腫瘍効果を観測した。担癌マウス作製方法、投与方法は以下の通りである。

【0083】

細胞懸濁液及び担癌マウスの作製

MDA-MB-231、HCC70及びSUM185PE細胞株を前述の方法によって培養し、トリプシンで剥離後約 7×10^6 細胞/mLになるようにMatrigel基底膜マトリックス(コーニング社製)にて懸濁し細胞懸濁液を調製した。27ゲージのシリンジを用い、0.1mLの細胞懸濁液を5週齢メスのヌードマウス(日本クレア社製)の皮下に注入することで担癌マウスを作製した。

【0084】

投与薬剤溶解液の調製

MEK阻害剤であるトラメチニブとPI3K阻害剤であるウォルトマンニンを1%ジメチルスルホキシド(DMSO)、を含むPBSにて各0.3mg/kgとなるように溶解し、投与薬剤溶解液とした。また、コントロールとしては1%DMSO含有PBSを使用した。

【0085】

投与方法及び実験デザイン

腫瘍体積が 300 mm^3 に達した個体を無作為に3群に分け投与を開始した。投与方法は投与薬剤溶解液を14日間毎日1回経口投与し、腫瘍体積を観測した。腫瘍体積は長径 \times (短径) $^2/2$ で算出した。

【0086】

2. 結果

図33~35に各種阻害剤による各群(コントロール群、トラメチニブ投与群、ウォルトマンニン投与群)個体数 $N=6$ の腫瘍成長抑制試験の結果を示す(図33:MDA-MB-231担癌マウス、図34:HCC70担癌マウス、図35:SUM185PE担癌マウス)。また、表11に14日間薬剤投与の翌日15日目の各群の腫瘍体積に関して、コントロール群間での有意差検定を行い算出されたp値の結果を示す。検定方法はマン・ホイットニーのU検定を用いた。

【表11】

	MDA-MB-231	HCC70	SUM185PE
トラメチニブ群	<0.005	<0.005	0.9372
ウォルトマンニン群	0.0656	<0.05	<0.05

【0087】

10

20

30

40

50

実施例7において「PI3K活性/MEK活性」が低値を示した、MEK阻害剤感受性株(MA)であるMDA-MB-231由来の腫瘍の増殖は、MEK阻害剤であるトラメチニブ投与で有意に抑制される一方、PI3K阻害剤であるウォルトマンニン投与では有意な抑制効果は得られなかった。

実施例7において「PI3K活性/MEK活性」が高値を示した、PI3K阻害剤感受性株(PA)であるSUM185PE由来の腫瘍の増殖は、PI3K阻害剤であるウォルトマンニン投与で有意に抑制される一方、MEK阻害剤であるトラメチニブ投与では有意な増殖抑制効果が得られなかった。

実施例7において「PI3K活性/MEK活性」が中間値を示した、両感受性株(S)であるHCC70由来の腫瘍の増殖は、PI3K阻害剤であるウォルトマンニン投与及びMEK阻害剤であるトラメチニブ投与にて薬剤間の効果は異なるものの、いずれの薬剤においても有意に増殖抑制効果が観測された。

【0088】

以上の結果から、癌患者から単離した癌組織細胞のPI3K活性/MEK活性の比を測定することにより、癌患者のがん治療に適した薬剤を選定する上で極めて有力な指針となり、選定された薬剤を優先的に投与することにより、効果的な治療を行うことができることが示唆された。すなわち、「PI3K活性/MEK活性」が低値を示した場合はMEK阻害剤を優先的に投与し、「PI3K活性/MEK活性」が高値を示した場合はPI3K阻害剤優先的に投与するという治療レジメンが成り立つので、「PI3K活性/MEK活性」は癌に対する化学療法のための効果予測因子と使用することが可能である。

とりわけ、トリプルネガティブ乳癌(TNBC)と診断された患者に対して新たな治療法を提供することも可能である。従来、TNBCと診断された患者は、腫瘍組織提出手術後、放射線療法もしくは抗がん剤を用いた化学療法を治療レジメンとして選択する。本願発明に係る方法はその際にどの抗がん剤を用いるべきかの指針(効果予測因子)の1つを提供できる。

【産業上の利用可能性】

【0089】

2種のプロテインキナーゼの活性測定を用いる解析方法による、癌細胞の新規サブタイプ分類法及び、該サブタイプ分類法に基づくガン細胞の薬剤耐性の判定方法は、生体由来の細胞のプロテインキナーゼの活性測定に基づく、該生体の薬剤効果判定の一助となり、かかる方法は、たとえば癌患者から単離した癌組織細胞を用いて、当該癌細胞の薬剤感受性を判定し、その結果を当該癌患者の薬剤治療の際に用いることなどにも応用できる。

【0090】

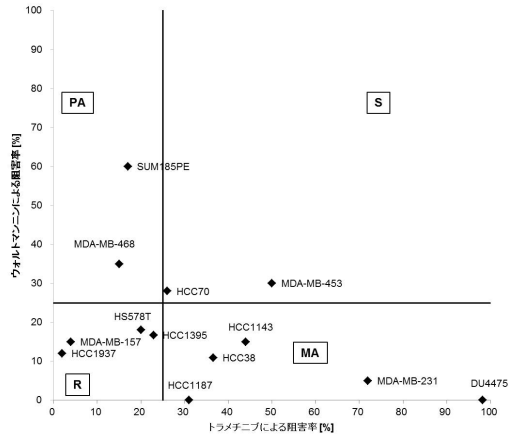
抗がん剤治療はそれ自体患者に対する負担も大きく、患者にあった治療レジメンを治療開始前に決めることは患者のQOL(Quality of Life)を保つ上でも重要である。本願発明の場合、外科手術前の化学治療(術前抗がん剤治療)の治療レジメンに応用できるだけでなく、外科手術で腫瘍摘出後の治療レジメンにも応用できる。

10

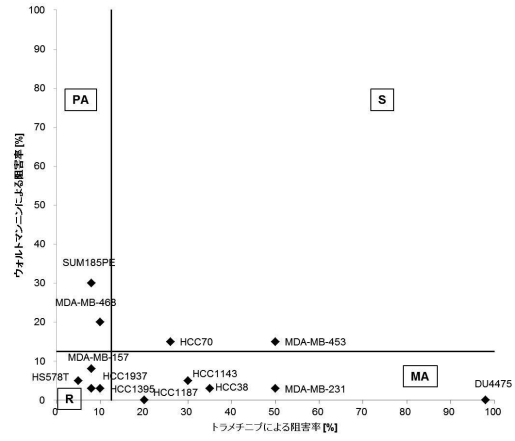
20

30

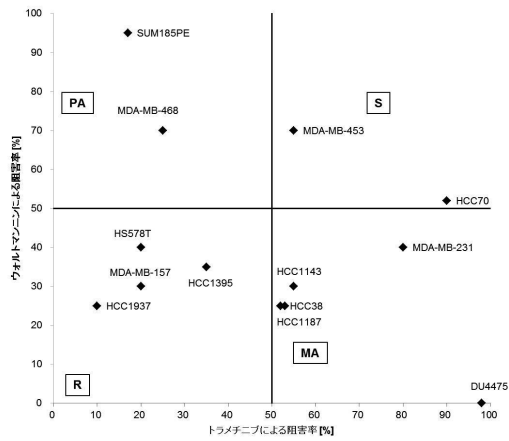
【図1A】



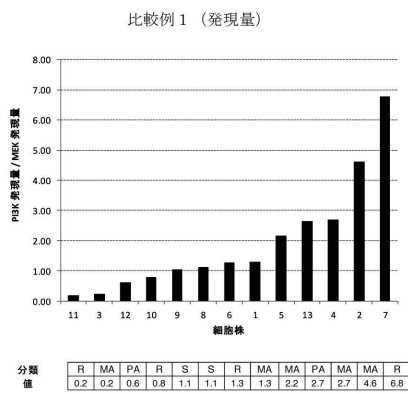
【図1B】



【図1C】

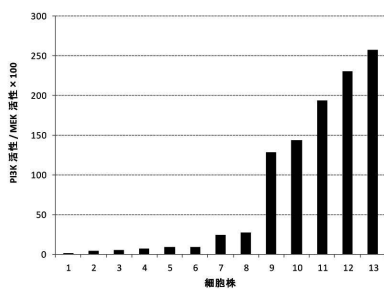


【図3】



【図2】

1) (活性) によるグリッド解析

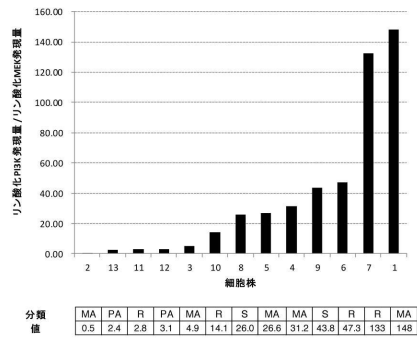


分類値

MA	MA	MA	MA	MA	R	R	S	S	R	R	PA	PA
1	4	5	6	8	9	24	27	128	144	193	230	257

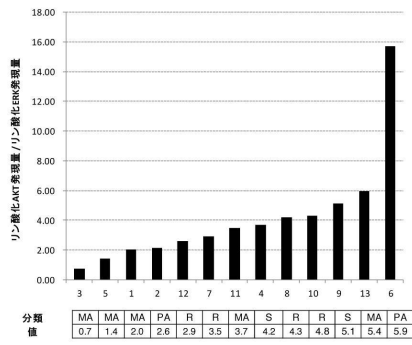
【図4】

比較例2 (リン酸化発現量)



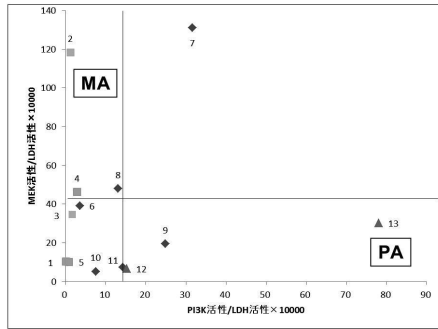
【図5】

比較例3 (リン酸化基質発現量)



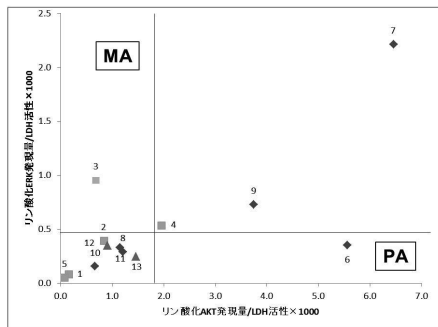
【図6】

1) (活性)によるグリッド解析



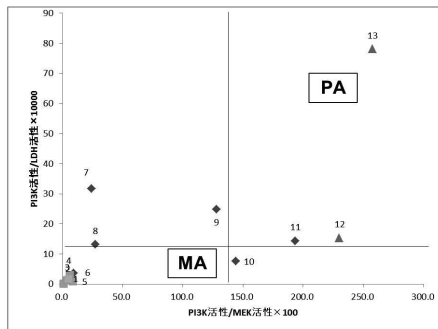
【図9】

1) のパラメーターをリン酸化基質発現量に置き換えたグリッド解析 (比較例6)



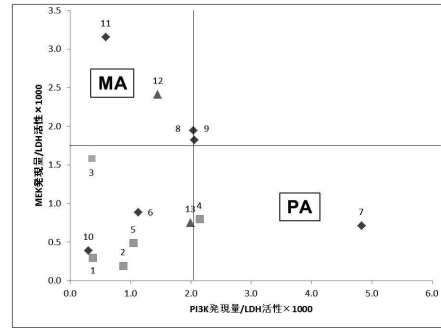
【図10】

2) (活性)によるグリッド解析



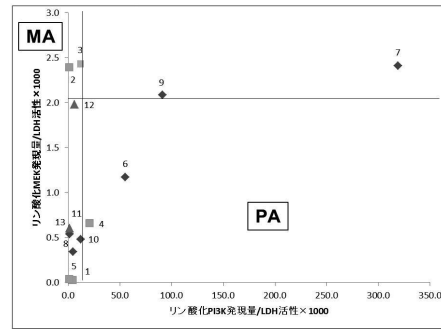
【図7】

1) のパラメーターを発現量に置き換えたグリッド解析 (比較例4)



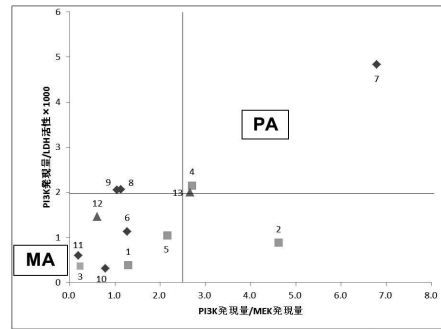
【図8】

1) のパラメーターをリン酸化発現量に置き換えたグリッド解析 (比較例5)



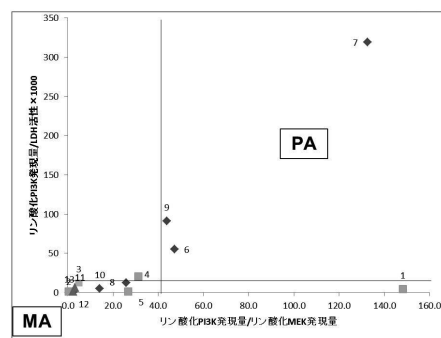
【図11】

2) のパラメーターを発現量に置き換えたグリッド解析 (比較例7)



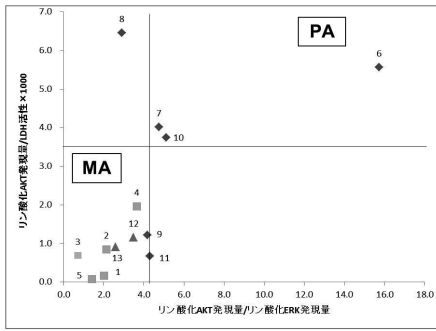
【図12】

2) のパラメーターをリン酸化発現量に置き換えたグリッド解析 (比較例8)



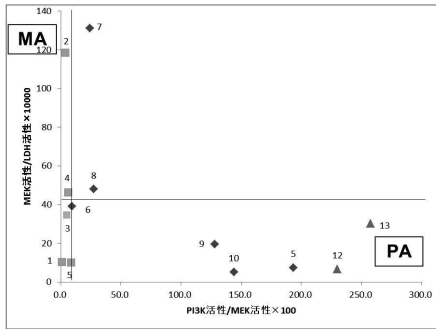
【図13】

2) のパラメーターをリン酸化基質発現量に置き換えたグリッド解析 (比較例9)



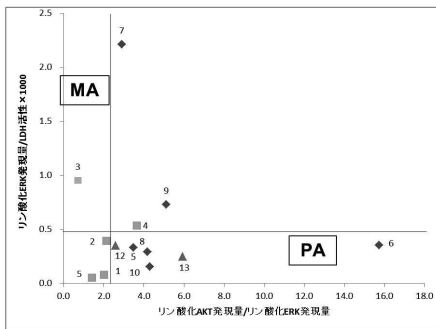
【図14】

3) (活性) によるグリッド解析



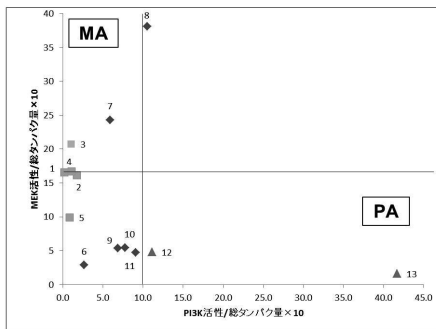
【図17】

3) のパラメーターをリン酸化基質発現量に置き換えたグリッド解析 (比較例12)



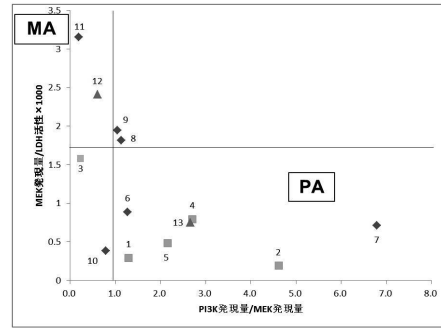
【図18】

4) (活性) によるグリッド解析



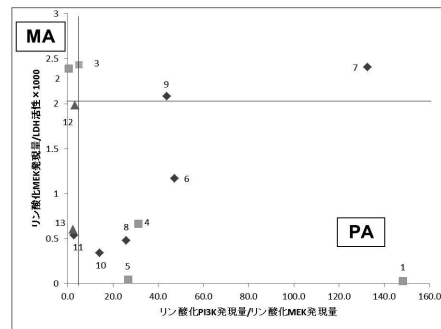
【図15】

3) のパラメーターを発現量に置き換えたグリッド解析 (比較例10)



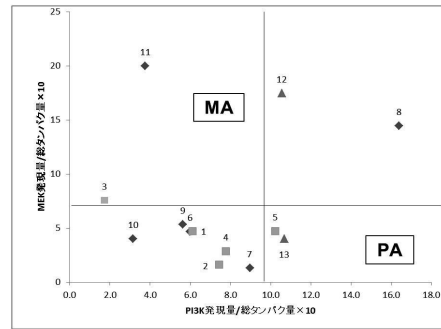
【図16】

3) のパラメーターをリン酸化発現量に置き換えたグリッド解析 (比較例11)



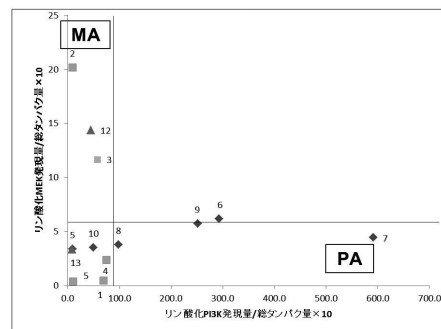
【図19】

4) のパラメーターを発現量に置き換えたグリッド解析 (比較例13)



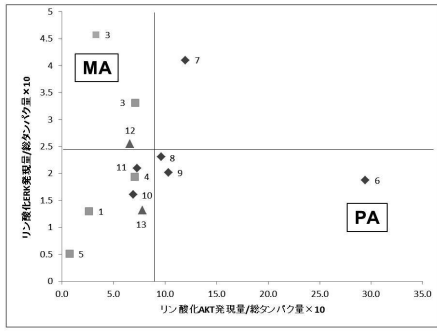
【図20】

4) のパラメーターをリン酸化発現量に置き換えたグリッド解析 (比較例14)



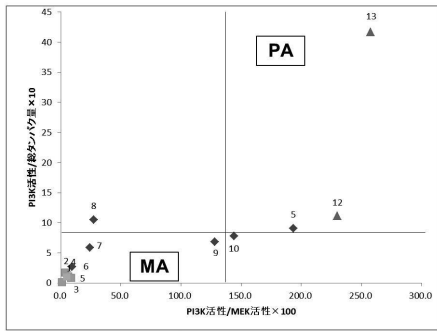
【図 2 1】

4) のパラメーターをリン酸化基質発現量に置き換えたグリッド解析 (比較例 1 5)



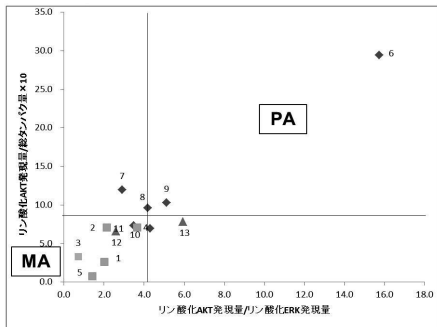
【図 2 2】

5) (活性) によるグリッド解析



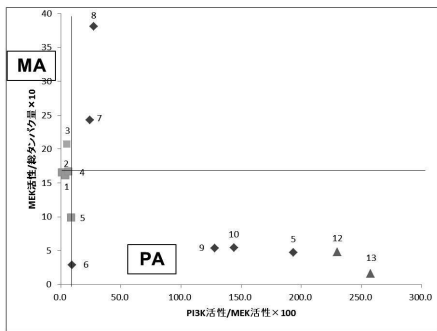
【図 2 5】

5) のパラメーターをリン酸化基質発現量に置き換えたグリッド解析 (比較例 1 8)



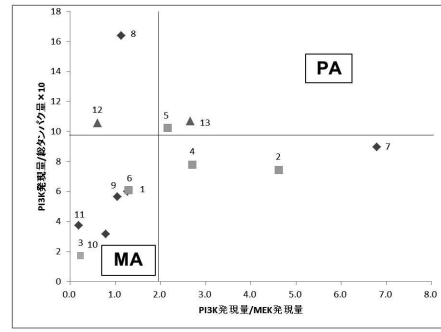
【図 2 6】

6) (活性) によるグリッド解析



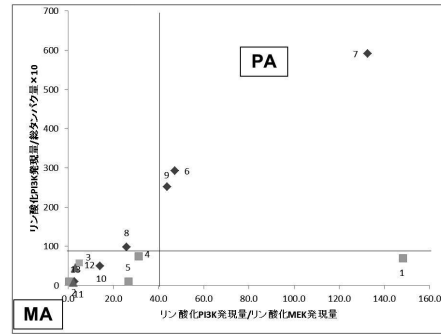
【図 2 3】

5) のパラメーターを発現量に置き換えたグリッド解析 (比較例 1 6)



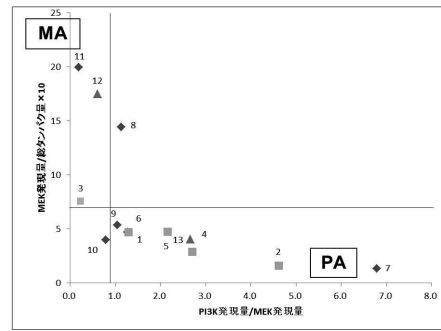
【図 2 4】

5) のパラメーターをリン酸化発現量に置き換えたグリッド解析 (比較例 1 7)



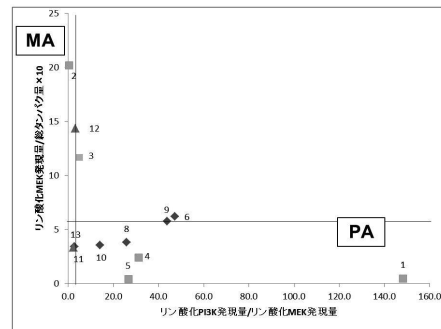
【図 2 7】

6) のパラメーターを発現量に置き換えたグリッド解析 (比較例 1 9)



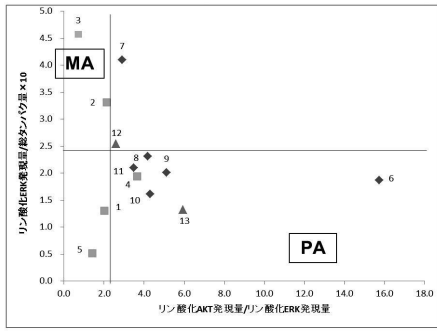
【図 2 8】

6) のパラメーターをリン酸化発現量に置き換えたグリッド解析 (比較例 2 0)

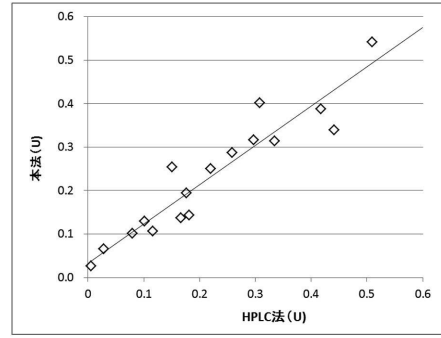


【 図 2 9 】

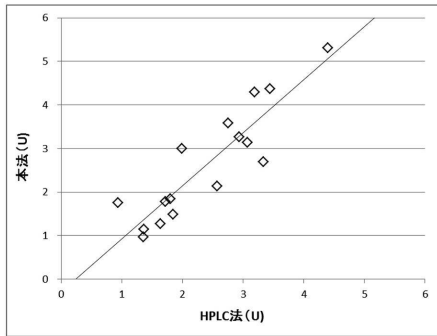
5) のパラメーターをリン酸化基質発現量に置き換えたグリッド解析 (比較例 2 1)



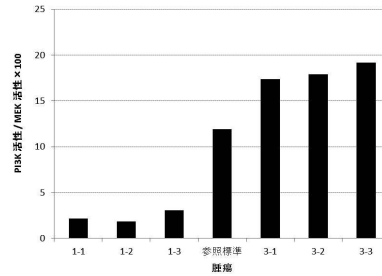
【 図 3 1 】



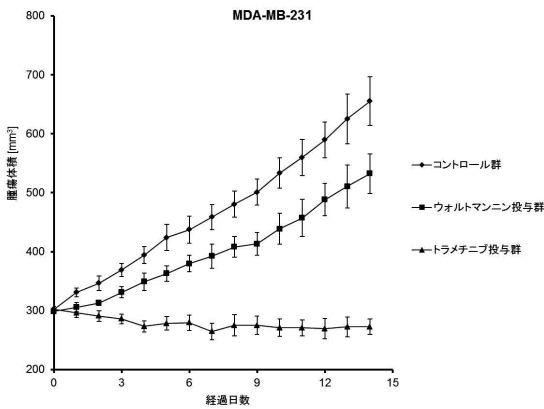
【 図 3 0 】



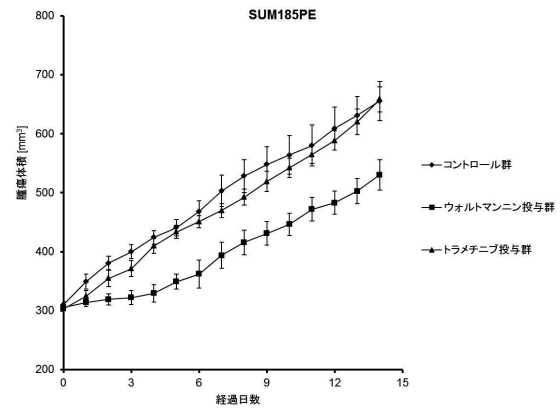
【 図 3 2 】



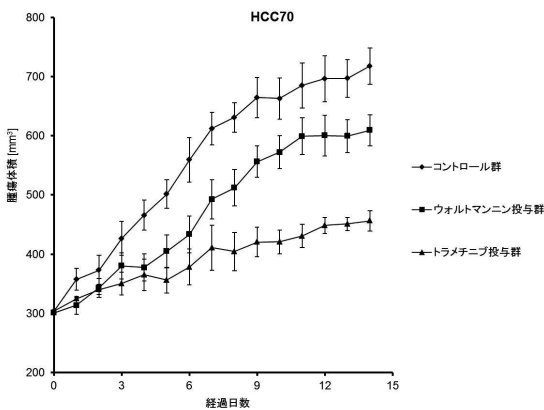
【 図 3 3 】



【 図 3 5 】



【 図 3 4 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	C 1 2 M	1/34	F
C 1 2 N	9/99	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	C 1 2 N	9/99	
			A 6 1 P	35/00	

審査官 戸来 幸男

- (56)参考文献 特表2015-515476(JP,A)
 特表2015-505959(JP,A)
 特表2013-517461(JP,A)
 特表2011-514522(JP,A)
 Clin. Cancer Res., 2015年10月 1日, vol.21, no.19, pp.4410-4419

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 1 / 6 6
 G 0 1 N 3 3 / 5 3 - 3 3 / 5 7 7
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S /
 W P I D S (S T N)
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)