

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6175711号  
(P6175711)

(45) 発行日 平成29年8月9日(2017.8.9)

(24) 登録日 平成29年7月21日(2017.7.21)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68 Z N A
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 P
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 V
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y

請求項の数 8 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-71040 (P2013-71040)	(73) 特許権者	304021831
(22) 出願日	平成25年3月29日 (2013. 3. 29)		国立大学法人 千葉大学
(65) 公開番号	特開2013-242298 (P2013-242298A)		千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号
(43) 公開日	平成25年12月5日 (2013. 12. 5)	(74) 代理人	100088904
審査請求日	平成28年3月23日 (2016. 3. 23)		弁理士 庄司 隆
(31) 優先権主張番号	特願2012-100681 (P2012-100681)	(74) 代理人	100124453
(32) 優先日	平成24年4月26日 (2012. 4. 26)		弁理士 資延 由利子
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100135208
			弁理士 大杉 卓也
(出願人による申告) 平成21年度文部科学省、独立行政法人科学技術振興機構、独自のシーズ展開事業「委託開発」、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願		(74) 代理人	100152319
			弁理士 曾我 亜紀
		(72) 発明者	丹沢 秀樹
			千葉県千葉市中央区本町3-3-16-1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 S-1による癌化学療法の投与効果の判定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

診断対象者から採取した生体由来試料における、デコリン遺伝子の発現を測定するステップaと、

測定結果として得られた該遺伝子の発現量が、構成的に発現する遺伝子の発現量と比較して高いことが、テガフル、ギメラシル、およびオテラシルカリウムの3成分を有効成分として配合した抗癌剤（以下、S-1と略称する）の投与効果において、S-1に対して耐性を有するとするステップbと、

を含むS-1化学療法における投与効果を判定するための方法。

【請求項2】

前記ステップaでは、上記遺伝子の産物であるタンパク質量を測定することを特徴とする請求項1記載のS-1化学療法における投与効果を判定するための方法。

【請求項3】

前記ステップaでは、上記遺伝子のmRNA量を測定することを特徴とする請求項1記載のS-1化学療法における投与効果を判定するための方法。

【請求項4】

前記生体由来試料は、S-1化学療法を施行する前に採取した生体由来試料であることを特徴とする請求項1記載のS-1化学療法における投与効果を判定するための方法。

【請求項5】

前記生体由来試料は、癌患者から採取した生体由来試料であることを特徴とする請求項1

10

20

記載の S - 1 化学療法における投与効果を判定するための方法。

【請求項 6】

前記生体由来試料は、頭頸部扁平上皮癌患者、食道扁平上皮癌患者、または肺扁平上皮癌患者から採取した生体由来試料であることを特徴とする請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の S - 1 化学療法における投与効果を判定するための方法。

【請求項 7】

S - 1 化学療法を施行する前に頭頸部癌患者から採取した生体由来試料において、デコリンタンパク質の発現を測定するステップ a と、  
測定結果として得られた該遺伝子の発現量が、構成的に発現する遺伝子の発現量と比較して高いことが、S - 1 の投与効果において、S - 1 に対して耐性を有するとするステップ b と、  
を含む S - 1 化学療法における投与効果を判定するための方法。

10

【請求項 8】

S - 1 化学療法を施行する前に頭頸部癌患者から採取した生体由来試料において、デコリンタンパク質の発現を抗デコリンタンパク質抗体を用いた免疫組織化学的染色 ( I H C ) により測定するステップ a と、  
I H C スコアが、1 視野の中の全細胞数のうち陽性細胞の百分率と染色性の強度とを掛け合わせた数の総和であって、染色性の強度として 3 段階の弱、中、強に評価され、それぞれに 1 ~ 3 の整数を割り当てることにより数値化し、無作為に抽出した 10 視野での平均値として、算出され、測定結果として得られた I H C スコアのカットオフ値として 1 1 9  
を用い、I H C スコアがカットオフ値以下であるとき、該 I H C スコアを示す生体由来試料は、S - 1 投与における S - 1 に対する感受性が高く、S - 1 投与による効果を期待しうるとするステップ b と、  
を含む S - 1 化学療法における投与効果を判定するための方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、テガフル、ギメラシル、およびオテラシルカリウムの 3 成分を有効成分として配合した抗癌剤 ( 以下、S - 1 と略称する ) による癌化学療法の投与効果を判定する方法に関する。より詳しくは本発明は、S - 1 による癌化学療法を実施する前にその投与効果を判定する方法に関する。さらに詳しくは本発明は、癌患者由来の生体試料においてデコリン遺伝子の発現を測定し、該遺伝子の発現量に基づいて S - 1 による癌化学療法の投与効果を判定する方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

S - 1 は、テガフル、ギメラシル、およびオテラシルカリウムの 3 成分を配合した経口の化学療法剤であり、頭頸部扁平上皮癌、消化器癌、およびその他の癌種における術前化学療法として一般的に広く使用されている。成分中のテガフルは、5 - フルオロウラシル ( 以下、5 - F U と略称する ) のプロドラッグであり、DNA 生合成を阻害することにより抗癌作用を発揮する。ギメラシルは、5 - F U の代謝酵素を選択的に阻害して 5 - F U 濃度を上昇させることにより抗腫瘍効果の増強をもたらす。また、オテラシルカリウムは、主に消化管組織に分布して消化管組織の障害を軽減させる作用がある。

40

【0003】

術前の単剤使用において S - 1 により 6 1 . 2 % に腫瘍縮小効果が認められたことを本発明者らは報告している ( 非特許文献 1 ) 。しかしながら、S - 1 投与の効果は、患者によってばらつきがあり、このために臨床効果がない患者にとっては、副作用に苦しみ予後不良となることがある。

【0004】

癌の化学療法では一般的に、化学療法剤による副作用の出現が多くの患者で認められること、また化学療法剤が奏効しない患者が認められることが知られている。このため、多

50

くの患者が重篤な副作用に苦しんだにも拘らず、治療効果が得られないままに癌が進行して予後不良となることがしばしばある。癌の化学療法に対する耐性については現在では良く知られており、化学療法剤耐性の克服を目的として、そのメカニズムや、化学療法による効果の増強剤が研究されてきている（非特許文献2 - 6および特許文献1 - 2等）。

【0005】

化学療法を受ける患者に適当な化学療法剤を選択する目的で、化学療法剤の治療効果を投与前に判定する方法が実施されることもある。例えば、先進医療において、癌患者の癌組織を採取し、該癌組織に含まれる癌細胞が化学療法剤に対して耐性かまたは感受性かを判断する手段として、細胞培養技術を用いた方法が実施されている。具体的には、癌患者の癌組織を採取して、そこから癌細胞を分離した後、細胞培養技術を用いて培養し、癌細胞がある程度増殖した段階で化学療法剤、すなわち抗癌剤を各濃度に調製した後、癌細胞培養液に添加して、その癌細胞が該抗癌剤に対して感受性かまたは耐性かを癌細胞の増殖度合いから測定する方法が実施されていた。しかし、このような癌細胞を培養するといった手技を含む診断方法は、診断結果を得るまでに3～4日間が必要であり、また細胞培養の手技が煩雑であることから、臨床現場での診断方法としてほとんど利用されていない。

10

【0006】

そこで、化学療法剤による治療効果を投与前に迅速に判定する方法を開発する試みがなされている。本願発明者も、シスプラチンによる治療効果の判定を遺伝子発現に基づいて実施する方法を開示している（特許文献3 - 4）。具体的には、シスプラチンによる治療効果の判定方法として、ホスホジエステラーゼ3B（phosphodiesterase 3B）遺伝子、血小板由来増殖因子C（platelet derived growth factor C）遺伝子、ポリシスチックキドニーディーズ-2（polycystic kidney disease-2）遺伝子、ニューレグリン1（neuregulin 1）遺伝子、およびルミカン（lumican）遺伝子から選ばれる少なくとも1以上の遺伝子の発現を測定してその発現量に基づいて判定を実施する方法、並びにこれら遺伝子の他にさらにデコリン遺伝子等の195種類の遺伝子のうち少なくとも1以上の遺伝子の発現を測定してその発現量に基づいて判定を実施する方法を開示している。

20

【0007】

デコリン（以下、DCNと略称することがある）は、繊維芽細胞によって生産される小さなプロテオグリカンである。プロテオグリカンは、1またはそれ以上のグリコサミノグリカン鎖を有するタンパク質である。デコリンのコアタンパク質は、分子量約40,000Daであり、既に配列決定されている。

30

【0008】

DCNは、細胞外マトリックスタンパク質であり、コラーゲン線維の形成や安定化により細胞間接着や細胞運動を調節することで、創傷治癒や炎症反応に関与することが知られている。また、DCNは、細胞膜で上皮成長因子受容体（以下、EGFRと略称する）と結合することにより、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（以下、MAPKと略称する）経路やホスファチジルイノシトール3キナーゼ/AKT（以下、PI3K/AKTと略称する）経路を介して細胞増殖やアポトーシス等様々な機能に関与していることが報告されている（図1参照、非特許文献7 - 9）。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特開2009 - 242378号公報。

【特許文献2】特開2011 - 102255号公報。

【特許文献3】国際公開第2008 / 047947号パンフレット。

【特許文献4】特開2009 - 247309号公報。

【非特許文献】

【0010】

50

【非特許文献1】「ジャーナル オブ キャンサー サイエンス アンド セラピー (Journal of Cancer Science and Therapy)」、2010年、第2巻、第5号、p. 132 - 135。

【非特許文献2】「キャンサー リサーチ (Cancer Research)」、2004年、第64巻、第22号、p. 8167 - 8176。

【非特許文献3】「エクスペリメンタル セル リサーチ (Experimental Cell Research)」、2003年、第288巻、第2号、p. 403 - 414。

【非特許文献4】「インターナショナル ジャーナル オブ オンコロジー (International Journal of Oncology)」、2003年、第22巻、第5号、p. 945 - 953。 10

【非特許文献5】「バイオキミカ エ バイオフィジカ アクタ (Biochimica et Biophysica Acta)」、2002年、第1587巻、第2 - 3号、p. 194 - 205。

【非特許文献6】「アンチキャンサー リサーチ (Anticancer Research)」、2008年、第28巻、p. 9 - 14。

【非特許文献7】「ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)」、2011年、第286巻、p. 34712 - 34721。

【非特許文献8】「ネオプラジア (NEOPLASIA)」、2009年、第11巻、第10号、p. 1042 - 1053。 20

【非特許文献9】「ザ インターナショナル ジャーナル オブ バイオケミストリー アンド セル バイオロジー (The International Journal of Biochemistry and Cell Biology)」、2008年、第40巻、p. 2120 - 2128。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

従来、S - 1による化学療法の治療効果を投与前に判定するには、癌患者の癌組織から採取した癌細胞をS - 1の存在下で培養し、その増殖度合いに基づいて該癌細胞のS - 1 30に対する反応性を判定する方法が採られていた。しかし、このような判定方法は、時間がかかる上に細胞培養の手技が煩雑であり、臨床現場での診断方法として多くの患者への利用価値が少ないため、臨床現場においてはほとんど利用されておらず、実用化に至っていない。

【0012】

本発明では、S - 1による癌の化学療法を施行する前に、その治療効果を迅速、簡便、かつ正確に判定する方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究を行い、化学療法剤に対して耐性を示す癌細胞での耐性関連遺伝子の発現が知られていることから、S - 1耐性関連遺伝子を特定し、該遺伝子または該遺伝子がコードするタンパク質の検出により、S - 1による治療効果を迅速、簡便、かつ正確にする判定する方法を提供することを試みた。 40

【0014】

そして、S - 1耐性にDCN遺伝子の発現が関連することを見出した。具体的には、5 - FUやシスプラチンに対して耐性機能を有する抗癌剤耐性細胞株においてDCN遺伝子の発現解析を行い、抗癌剤耐性細胞株においてDCN遺伝子の顕著な発現亢進を認めた。一方、耐性細胞株におけるDCN遺伝子の発現抑制を、該遺伝子に特異的なショートヘアピンRNA (以下、shRNAと略称する)の該耐性細胞株への導入により行った結果、5 - FUに対する感受性の増加が観察された。また、耐性細胞株およびDCN発現を抑制 50

した耐性細胞株（以下、s h D C N細胞株と略称する）を移植したヌードマウスを用いて S - 1 投与効果を検証した結果、s h D C N細胞株移植マウスでは耐性細胞株移植マウスと比較して腫瘍体積の有意な減少を認めた。S - 1 投与により、s h D C N細胞株では有意にリン酸化 A K T 量の減少が認められたことから、D C N 発現抑制と S - 1 投与により、アポトーシスの誘導に關与する A K T のリン酸化が阻害され、アポトーシスが促進されることが判明した。このように、D C N 発現抑制と抗癌剤耐性の低下とが關連することをインビトロ ( i n v i t r o ) およびインビボ ( i n v i v o ) の実験系で明らかにした。

【 0 0 1 5 】

さらに、臨床検体における D C N 発現と S - 1 による奏効度とが關連することを見出した。

10

【 0 0 1 6 】

これら研究結果から、D C N 遺伝子が S - 1 耐性に關連する遺伝子であると特定し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 7 】

すなわち、本発明は、診断対象者から採取した生体由来試料における、D C N 遺伝子の発現を測定するステップ a と、測定結果として得られた該遺伝子の発現量に基づいて S - 1 の投与効果を判定するステップ b と、を含む S - 1 化学療法における投与効果判定方法に關する。

【 0 0 1 8 】

また本発明は、前記ステップ a では、上記遺伝子の産物であるタンパク質量を測定することを特徴とする前記 S - 1 化学療法における投与効果判定方法に關する。

20

【 0 0 1 9 】

さらに本発明は、前記ステップ a では、上記遺伝子の m R N A 量を測定することを特徴とする前記 S - 1 化学療法における投与効果判定方法に關する。

【 0 0 2 0 】

さらにまた本発明は、前記生体由来試料が、S - 1 化学療法を施行する前に採取した生体由来試料であることを特徴とする前記 S - 1 化学療法における投与効果判定方法に關する。

【 0 0 2 1 】

また本発明は、前記生体由来試料が、癌患者から採取した生体由来試料であることを特徴とする前記 S - 1 化学療法における投与効果判定方法に關する。

30

【 0 0 2 2 】

さらに本発明は、前記生体由来試料が、頭頸部扁平上皮癌患者、食道扁平上皮癌患者、または肺扁平上皮癌患者から採取した生体由来試料であることを特徴とする前記 S - 1 化学療法における投与効果判定方法に關する。

【 0 0 2 3 】

さらにまた本発明は、S - 1 化学療法を施行する前に頭頸部癌患者から採取した生体由来試料において、D C N タンパク質の発現を測定するステップ a と、測定結果として得られた D C N タンパク質の発現量に基づいて、S - 1 の投与効果を判定するステップ b と、を含む S - 1 化学療法における投与効果判定方法に關する。

40

【 0 0 2 4 】

また本発明は、S - 1 化学療法を施行する前に頭頸部癌患者から採取した生体由来試料において、デコリンタンパク質の発現を抗デコリンタンパク質抗体を用いた免疫組織学的染色により測定するステップ a と、測定結果として得られた免疫組織化学的染色 ( I H C ) スコアのカットオフ値として 1 1 9 を用い、S - 1 の投与効果を判定するステップ b と、を含む S - 1 化学療法における投与効果判定方法に關する。

【 0 0 2 5 】

さらに本発明は、診断対象者から採取した生体由来試料における、デコリン遺伝子の発

50

現を測定するステップと、測定結果として得られた該遺伝子の発現量に基づいて、5-FUを有効成分として配合した抗癌剤の投与効果を判定するステップと、を含む抗癌剤化学療法における投与効果判定方法に関する。

【発明の効果】

【0026】

本発明によれば、診断対象者から採取した生体由来試料における、DCN遺伝子の発現を測定するステップaと、測定結果として得られた該遺伝子の発現量に基づいてS-1の投与効果を判定するステップbと、を含むS-1化学療法における投与効果判定方法を提供できる。

【0027】

本発明に係るS-1化学療法における投与効果判定方法により、S-1に対する耐性または感受性の判定が可能となり、S-1投与による奏効の有無を、客観的に簡便、迅速かつ高い精度で判定することができる。したがって、本発明に係るS-1化学療法における投与効果判定方法を実施することにより、対象となる患者に対してS-1投与を含む治療を適用するか否かの判定を行うことができる。

【0028】

このように、本発明によりS-1化学療法による治療効果を投与前に判定できるため、患者にとって大きな生活の質(Quality of Life、以下QOLと略称する)の向上を図ることができ、かつ医療費の削減に貢献できる。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】DCNが細胞の増殖やアポトーシスに関与することを示す経路の特性図である。DCNは細胞膜上のEGFRに結合することで、細胞のアポトーシスを司る経路の1つであるPI3K/AKT経路により細胞の生存に関与する。

【図2】抗癌剤耐性細胞株および親株におけるDCN発現をウエスタンブロッティングにて検出した結果を示す図である。抗癌剤耐性細胞株であるSa-3R株、H-1R株、KB-R株において親株と比較してDCNの発現亢進を認めた。(実施例1)

【図3】DCNに特異的なショートヘアピンRNA(以下、DCN shRNAと略称する)を導入してDCN発現抑制した抗癌剤耐性細胞株(以下、shDCN細胞株と称する)において、DCN発現を測定した結果を示す図である。右図はDCN mRNAをRT-PCRで検出した結果を示す。左図はDCNのタンパク質量をウエスタンブロッティングにて測定した結果を示す。DCN shRNAを導入した抗癌剤耐性細胞株では、ベクターのみを導入した抗癌剤耐性細胞株(以下、Mock細胞株と称する)と比較し、mRNA量およびタンパク質量が有意に低下した。(実施例1)

【図4】抗癌剤耐性細胞株へのDCN shRNA導入による細胞増殖能の変化の有無を検証した結果を示す図である。計測を行った全期間を通して、Mock細胞株とshDCN細胞株の細胞増殖能に有意な差は認められなかった。図の横軸は計測期間(Time(hour))を、縦軸は細胞数(Cell number)を示す。(実施例2)

【図5】shDCN細胞株およびMock細胞株の5-FU感受性試験の結果を示す図である。shDCN細胞株はMock細胞株と比較し、約10倍低いIC50値を示した。すなわち、shDCN細胞株では5-FUに対する感受性が約10倍上昇した。図の横軸は5-FU濃度(5-FU concentration)を、縦軸は生細胞の割合(Cell survival rate)を示す。(実施例2)

【図6】shDCN細胞株由来腫瘍のS-1感受性の検証をin vivoで行った結果を示す図である。DCNを高発現する抗癌剤耐性細胞株であるSa-3R株およびKB-R株、並びにそれらのMock細胞株およびshDCN細胞株を各々ヌードマウスの背部に移植し、S-1の経口投与による効果を測定した。Sa-3R株に関する結果を上段の2図に、KB-R株に関する結果を下段の2図に示す。Sa-3R株およびKB-R株のいずれにおいても、shDCN細胞株を移植したS-1経口投与群で、他の群と比較して有意に腫瘍体積(Tumor volume)の抑制を認めた。(実施例3)

10

20

30

40

50

【図7】shDCN細胞株由来腫瘍のS-1感受性を検証したin vivo実験において、S-1投与およびDCN発現抑制によるマウスに対する毒性の評価を目的として体重変化を測定した結果を示す図である。S-1投与およびDCN発現抑制によるマウスの体重(Body weight)の有意な変化は認められなかった。(実施例3)

【図8】shDCN細胞株由来腫瘍のS-1感受性を検証したin vivo実験において、マウスに移植した腫瘍組織をTUNEL法により染色した結果を示す図である。shDCN細胞株を移植したS-1経口投与群で、他の群と比較して明らかにアポトーシスの増加を認めた。(実施例3)

【図9】shDCN細胞株由来腫瘍のS-1感受性を検証したin vivo実験において、マウスに移植した腫瘍組織について抗増殖細胞核抗原(Proliferating Cell Nuclear Antigen; 以下、PCNAと略称する)免疫組織学的染色を行った結果を示す図である。shDCN細胞株を移植したS-1経口投与群で、他の群と比較して明らかに細胞増殖の減少を認めた。(実施例3)

10

【図10】shDCN細胞株由来腫瘍のS-1感受性を検証したin vivo実験において、マウスに移植した腫瘍組織におけるAKT発現を免疫組織学的染色により検証した結果を示す図である。全ての群においてAKT発現に明らかな差は認められなかった。(実施例3)

【図11】shDCN細胞株由来腫瘍のS-1感受性を検証したin vivo実験において、マウスに移植した腫瘍組織におけるリン酸化AKT(pAKT)量を免疫組織学的染色により検証した結果を示す図である。shDCN細胞株を移植したS-1経口投与群で、他の群と比較してリン酸化AKT量の減少を認めた。(実施例3)

20

【図12】shDCN細胞株由来腫瘍のS-1感受性を検証したin vivo実験において、マウスに移植した腫瘍組織についてAKTおよびリン酸化AKT(pAKT)を免疫組織学的染色(以下、IHCと略称することがある)で検出した組織切片のIHCスコアを統計学的に解析した結果を示す図である。AKT発現については各群で差は認められなかったが、pAKT量についてはshDCN細胞株を移植したS-1経口投与群で他の群と比較して有意な減少を認めた。(実施例3)

【図13】頭頸部癌患者の術前生検試料のDCN発現を免疫組織学的染色により検証した結果およびIHCスコアの分布を示す図である。生検後にS-1投与が行われた16症例の組織標本を用いて、免疫組織学的染色によるDCN発現を調べた。臨床検体の内訳は、S-1投与の奏効群(CR群)7例と非奏効群(SD/PD群)9例である。図上部にCR群とSD/PD群の免疫組織学的染色の代表例を示す。下図は、各群のDCN IHCスコア(%免疫反応強度)(DCN IHC scores(% intensity of immunoreactions))の分布を示す。SD/PD群ではCR群と比較し有意にDCNの発現亢進が認められたことから、DCN発現量とS-1投与の奏効度との相関関係が示唆された。(実施例4)

30

【図14】生検後にS-1投与が行われた頭頸部癌患者のCR群とSD/PD群において、生検試料で認められるDCNのIHCスコアのカットオフ値をROC曲線(ROC curve)により求めた結果を示す図である。図の横軸は1-特異度(1-specificity)を、縦軸は感度(sensitivity)を示す。(実施例4)

40

【図15】生検後にS-1投与が行われた頭頸部癌患者のCR群とSD/PD群において、生検試料で認められるDCNのIHCスコアのカットオフ値をヨーデン指標(Youden index)により求めた結果を示す図である。図の横軸は1-特異度(1-specificity)を、縦軸は感度(sensitivity)を示す。(実施例4)

【発明を実施するための形態】

【0030】

本発明の一つの実施形態について詳細に説明するとすれば、以下のとおりである。なお、本発明はこれに限られたものではない。

【0031】

本発明に係るS-1化学療法における投与効果判定方法は、診断対象者から採取された

50

生体由来試料におけるDCN遺伝子の発現を測定するステップaと、測定結果として得られた該遺伝子の発現量に基づいてS-1の投与効果を判定するステップbとを含んでいる。

【0032】

S-1は、テガフルとギメラシルとオテラシルとを1:0.4:1のモル比で配合した抗癌剤である。かかる抗癌剤として具体的には大鵬薬品工業株式会社のティーエスワン（登録商標）を例示できる。本発明に係るS-1化学療法における投与効果判定方法の適用対象となる化学療法剤は、テガフル、ギメラシル、およびオテラシルカリウムの3成分を有効成分として配合した抗癌剤である限りにおいて特に限定されず、好ましくは、テガフルとギメラシルとオテラシルとを1:0.4:1のモル比で配合した抗癌剤である。

10

【0033】

DCN遺伝子の塩基配列および該遺伝子によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列は既に報告されている。ヒトDCN遺伝子の塩基配列および該遺伝子によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列として、GenBankにアクセッション番号AF138300（VERSION:AF138300.1 GI:5532410）として登録されている配列を、配列表の配列番号1および2に記載する。

【0034】

診断対象者は、特に限定されず、各種癌に罹患した患者、悪性癌を疑われた者および健常者の何れであっても良い。また、本発明に係るS-1化学療法における投与効果判定方法は、診断対象者に対して直接何らかの処置を施すものではなく、診断対象者から採取した生体由来試料を用いて実施する。

20

【0035】

生体由来試料は、診断対象者における遺伝子発現解析が可能であれば特に限定されず、例えば、診断対象者から単離された組織、細胞、体液、尿およびそれらの混合物を挙げることができる。ここで体液とは、血液、リンパ液、組織液（組織間液、細胞間液、間質液）、体腔液、漿膜腔液、胸水、腹水、心のう液、脳脊髄液（髄液）、関節液（滑液）、眼房液（房液）、消化液、膵液、腸液、精液および羊水を含む意味である。また、使用する生体由来試料は、組織、細胞、体液、尿およびその他生体由来のタンパク質抽出液のいずれか一種類でも複数でも良い。

30

【0036】

生物学的試料は、癌細胞を含む試料、あるいは癌細胞を含むことが疑われる試料であることが好ましく、例えば、癌患者の治療目的で行われた手術の際に得られた組織の一部、癌を疑われた診断対象者から生検等によって採取された組織の一部を好ましく例示できる。

【0037】

生物学的試料は、S-1化学療法を施行する前に採取した生体由来試料が好ましい。このような生体由来試料を使用することにより、S-1化学療法を施行する前にS-1に対する耐性または感受性の予測が可能になり、その結果、診断対象者に対してS-1投与を含む治療を適用するか否かの判定、すなわち、S-1投与を含む治療を適用する対象の選別を実施することができる。

40

【0038】

生物学的試料は、診断対象者から単離された組織、細胞、体液、尿およびそれらの混合物等から調製したタンパク質抽出液や核酸抽出液であっても良い。タンパク質抽出液や核酸抽出液の調製は、自体公知のタンパク質調製法や核酸調製法を利用して実施できる。

【0039】

診断対象者から採取した生体由来試料におけるDCN遺伝子の発現の測定は、具体的には、例えば、測定対象の遺伝子に対するmRNA量を測定するかまたは測定対象の遺伝子産物であるタンパク質量を測定することにより実施する。

【0040】

50

測定対象の遺伝子産物であるタンパク質を測定する方法としては、公知のタンパク質検出方法を用いることができる。具体的には、測定対象のタンパク質に対する抗体を使用した各種の方法を適用できる。

【0041】

なお、測定対象のタンパク質を抗原とし、当該抗原に結合する限り、前記抗体としては、ヒト型抗体、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体等を適宜用いることができる。抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であっても良いが、均質な抗体を安定的に生産できる点で、モノクローナル抗体が好ましい。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は、当業者に周知の方法により作製できる。また、市販されている抗体から所望の抗体を選択して利用することもできる。

10

【0042】

モノクローナル抗体を産生するハイブリドマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、目的の抗原や目的の抗原を発現する細胞を感作抗原として使用し、これを通常の免疫方法に従って所望の動物に免疫して得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって既知の親細胞と融合させた後、通常のスクリーニング方法で所望のモノクローナル抗体産生細胞（ハイブリドマ細胞）を選別することにより作製できる。ハイブリドマの作製は、例えば、ミルステインらの方法（「メソッズ オブ エンザイモロジー（Methods of Enzymology）」、1981年、第73巻、p. 3 - 46）等に準じて実施できる。

【0043】

ここで、モノクローナル抗体を作製する際には、上述した遺伝子産物を抗原として使用することができ、また、上述した遺伝子産物の断片を発現する細胞を抗原として使用することができる。なお、これらのタンパク質もしくは当該タンパク質の断片は、例えば、例えばサムブルック等編、「モレキュラークロニング ア ラボラトリーマニユアル」、第2版、第1 - 3巻、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス出版、ニューヨーク1989年等の成書に記載された方法に準じて、当業者であれば容易に取得できる。また、これらタンパク質もしくは当該タンパク質の断片を発現する細胞も上記の方法に準じて、当業者であれば容易に取得できる。

20

【0044】

得られたモノクローナル抗体は、測定対象のタンパク質の定量用に、エンザイム・リンクイムノソルベント・アッセイ（ELISA）、酵素イムノドット・アッセイ、ラジオイムノ・アッセイ、凝集に基づいたアッセイあるいは他の知られているイムノアッセイ法で検査薬として用いることができる。また、モノクローナル抗体は標識されることが望ましい。標識化を行う際は、標識化合物として、例えば、当該分野で公知の酵素、蛍光物質、化学発光物質、放射性物質、染色物質等を使用できる。

30

【0045】

タンパク質の定量のためにタンパク質や抗体を支持体に固定して使用することもできる。支持体としては、例えば、タンパク質を固定化できるものであれば良い。一般的には、ガラス板、シリコンウエハ、樹脂等の無機材料または天然高分子材料のニトロセルロースや合成高分子材料のナイロンやポリスチレン等を例示できる。

40

【0046】

測定対象の遺伝子に対するmRNA量を測定する方法としては、公知の遺伝子発現検出方法を用いることができる。例えば、ノーザンブロッティング法、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リアルタイム-PCR（RT-PCR）、ハイブリダイゼーション法およびDNAアレイ法等を使用してmRNA量の測定を実施できる。また、測定対象の遺伝子に対して、ストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA配列を有するポリヌクレオチドをプローブとして用いて公知の方法でmRNA量の測定を実施できる。例えば、プローブを作製する際に当該プローブに適宜蛍光標識等の標識を付与しておき、これを診断対象者から採取した生体由来試料から単離・精製したmRNAまたは該mRNAから合成したcDNAとハイブリダイズする。その後、ハイブリダイズしたプローブに由来する蛍光

50

強度を測定することにより、測定対象の遺伝子の mRNA 量を検出することができる。なお、プローブは、ガラスビーズやガラス基板等の支持体に固定化して使用することもできる。すなわち、プローブは、測定対象の遺伝子について作製したプローブを支持体上に固定化したマイクロアレイまたは DNA チップの形で用いることもできる。支持体としては、ポリヌクレオチドを固定できるものであれば特に限定されるものではなく、どのような形状や材質であっても良い。支持体として、一般的には、例えば、ガラス板、シリコンウエハ、樹脂等の無機素材、また天然高分子材料としてニトロセルロースや合成高分子材料としてナイロン等を挙げることができる。

**【 0 0 4 7 】**

支持体上に固定するポリヌクレオチドは、合成オリゴヌクレオチドであっても良い。また、合成オリゴヌクレオチドの配列上に蛍光標識が可能な核酸誘導体を導入することも可能である。また、支持体上で目的のオリゴヌクレオチドを合成できる、いわゆるアフィメトリックス型の DNA チップ技術を用いることもできる。さらに、支持体が 3 次元構造をした、いわゆる東レ株式会社製の 3 D - G e n e 型の柱状の面に所望のポリヌクレオチドをスポットして固定化することもできる。

10

**【 0 0 4 8 】**

なお、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、例えば、42 で 1 × S S C ( 0 . 1 5 M N a C l , 0 . 0 1 5 M クエン酸ナトリウム )、0 . 1 % の硫酸ドデシルナトリウム ( S D S ) を含む緩衝液による 42 での洗浄処理によってもハイブリダイズを維持することを意味する。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を与える要素としては、上記温度条件以外に種々の要素があり、当業者であれば種々の要素を組み合わせ、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジェンシーと同等のストリンジェンシーを実現することが可能である。

20

**【 0 0 4 9 】**

D C N 遺伝子に由来する mRNA や c D N A を定量的に検出するためのプローブおよびプライマーセットは、該 mRNA や c D N A を特異的に検出することができる限りにおいて特に限定されず、D C N 遺伝子の塩基配列情報に基づいて適宜設計でき、常法に従って合成により取得できる。また、市販されている D C N 遺伝子検出用のプライマーやプローブから所望のものを選択して利用することもできる。

**【 0 0 5 0 】**

以上のようにして、診断対象者から採取した生体由来試料における D C N 遺伝子の発現量を測定した後、本発明に係る S - 1 投与効果判定方法では、当該発現量に基づいて S - 1 投与による効果の有無または効果の程度を判定する。

30

**【 0 0 5 1 】**

具体的には、上述したいずれかの方法により D C N 遺伝子の発現量を測定した後、当該遺伝子の発現量を評価する。発現量の評価は、基準値を設定し、この基準値との比較によって行っても良い。基準値としては遺伝子の構成的発現量を設定でき、該基準値に対する相対値により発現量の評価を行うことができる。診断対象者から採取した生体由来試料における D C N 遺伝子の発現量が基準値と比較して高ければ、診断対象者は S - 1 に対して耐性を有すると判断できる。逆に、診断対象者から採取した生体由来試料における D C N 遺伝子の発現量が基準値と比較して低ければ、診断対象者は S - 1 に対して感受性を有すると判断できる。

40

**【 0 0 5 2 】**

D C N 遺伝子の発現量の測定はまた、後述する実施例に示したように免疫組織化学染色 ( 以下、I H C と略称することがある ) や、免疫細胞化学染色 ( I C C と略称することがある ) を行い、そのスコアにて評価し、疑陽性と疑陰性を評価できる値を基準値としても良い。I H C および I C C は、抗原性を有する物質、主にタンパク質に対して特異的に結合する抗体を作用させ、抗原抗体反応を起こすことで組織中や細胞中の当該物質を検出する方法であり、被検試料として組織を使用するものを I H C、細胞を使用するものを I C C と呼ぶ。検出用抗体にはあらかじめ可視化できる物質、例えば蛍光色素、または不溶性

50

色素を生成する酵素を標識したものを使用し、それにより物質の検出を容易に実施できる。

【0053】

IHCスコアは、対物レンズ40倍で観察し、1視野の中の全細胞数のうち陽性細胞の百分率と染色性の強度とを掛け合わせた数の総和である。染色性の強度は、例えば3段階、すなわち弱、中、強に評価して、それぞれに1~3の整数を割り当てることにより数値化する。これを無作為に抽出した10視野で行い、その平均値としてIHCスコアを算出する。IHCスコアは、染色強度と染色範囲を示す優れたスコアとして、現在、一般的に用いられている染色度判定方法である。

【0054】

DCN遺伝子の発現量をIHCで測定してその発現量を評価する場合、IHCスコアのカットオフ値を基準値として使用することができる。カットオフ値として、具体的には、100-120、好ましくは105-120、より好ましくは110-120、さらに好ましくは115-120、さらにより好ましくは119を例示できる。すなわち、DCNのIHCスコアがカットオフ値以下であるとき、該IHCスコアを示す生体由来試料はS-1投与に対する感受性が高く、S-1投与による効果を期待し得ると判定する。

【0055】

本発明に係るS-1化学療法における投与効果判定方法によれば、非常に優れた感度および優れた特異度で診断対象者についてS-1投与による効果の有無または効果の程度を判断することができる。ここでは、感度とは、S-1投与に奏効する患者群における陽性率を意味する。また、特異度とは、S-1投与に奏効しない患者群における陰性率を意味する。

【0056】

本発明に係るS-1化学療法における投与効果判定方法によれば、抗癌剤投与や化学療法開始前の癌患者から採取した生体由来試料を用いた遺伝子発現解析、例えばmRNAレベルあるいはタンパク質レベルの発現解析により、S-1投与による効果をより客観的、特異的に判定することができることから、投与効果を期待できない患者に対する過度の負担となるようなS-1の投与を防止することができ、当該患者にとって有効な治療方針の知見を提供することができる。

【0057】

本発明に係るS-1化学療法における投与効果判定方法を適用する対象は、治療の選択肢としてS-1投与が想定される癌であれば特に限定されず、例えば、頭頸部癌、食道癌、肺癌、胃癌、胆道癌、胆管癌、肝臓癌、膵臓癌、大腸癌、好ましくは頭頸部扁平上皮癌、食道扁平上皮癌、および肺扁平上皮癌を例示できる。

【0058】

本発明に係るS-1化学療法における投与効果判定方法によれば、S-1投与の効果判定のみでなく、5-FUを有効成分として配合した抗癌剤の投与効果判定も同様に実施することができる。

【0059】

以下、実施例を用いて本発明を詳細に説明するが、本発明に係る技術的範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

【0060】

<抗癌剤耐性細胞株におけるDCNの発現解析>

抗癌剤耐性細胞株として、5-FUやシスプラチンに対して薬剤耐性機能を示す癌細胞株(「インターナショナル ジャーナル オブ キャンサー(International Journal of Cancer)」, 2010年、第126巻、第2号、p. 437-449)を使用した。具体的には、口腔扁平上皮癌由来のSa-3細胞株およびH-1細胞株、並びに頭頸部扁平上皮癌由来のKB細胞株から樹立した抗癌剤耐性細胞株であるSa-3R株、H-1R株、KB-R株を使用した。

10

20

30

40

50

## 【0061】

まず、抗癌剤耐性細胞株および親株におけるDCNの発現解析を、ウエスタンブロッティングによるタンパク質の検出により行った。具体的には、硫酸ドデシルナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS - PAGE) にて分離したタンパク質をニトロセルロース膜に転写し、スキムミルクにてブロッキングの後、抗ヒトDCNラビットポリクローナル抗体 (Santa Cruz社製) を1:1000の希釈濃度で室温にて2時間反応させ、十分に洗浄し、ホースラディッシュパーオキシダーゼ (HRP) 標識抗ラビット二次抗体を1:2500の希釈濃度で室温にて1時間反応させ、発光するバンドを確認した。また、内在性のローディングコントロールとして  $\beta$ -チューブリンの発現解析を同様に行った。その結果、図2に示すように抗癌剤耐性細胞株においてDCNの発現亢進を認め、 $\beta$ -チューブリン発現に差は認められなかった。

10

## 【実施例2】

## 【0062】

< DCN発現抑制と抗癌剤耐性度の低下 (in vitro実験) >

DCN発現量と抗癌剤耐性度の関連について、in vitro実験系を用いて検討した。癌細胞として、DCNの高発現亢進が認められた抗癌剤耐性細胞株Sa-3R株およびKB-R株を使用した。また、これら抗癌剤耐性細胞株においてDCN発現が抑制された細胞を作製した。これら細胞を抗癌剤の存在下で培養し、抗癌剤への耐性度を比較した。

## 【0063】

具体的には、抗癌剤耐性細胞株Sa-3R株およびKB-R株に対して、DCN shRNAを導入することにより、これら細胞株でのDCN発現を抑制した。DCN shRNAはSanta Cruz社製のDecorin shRNA Plasmid (h) (カタログ番号SC-40993-SY) を使用し、コントロールshRNAとしてSanta Cruz社製のControl shRNA Plasmid - A (カタログ番号SC-108060) を使用した。導入試薬には、リポフェクトアミン (Lipofectamine、Invitrogen社製) を使用した。

20

## 【0064】

Sa-3R株およびKB-R株にDCN shRNA (Santa Cruz社製) を導入し、ネオマイシン  $1.0 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 1.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  を含む選択培地中でセクションを行い、DCN発現抑制が安定的に行われている細胞コロニーを選択し、mRNAおよびタンパク質発現をRT-PCRおよびウエスタンブロッティングを用いて解析した。また、mRNAの解析において、内在性のローディングコントロールとして  $\beta$ -チューブリンの発現解析を同様に行った。ウエスタンブロッティングでは、内在性のコントロールとしてグリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の解析を同様に行い、各細胞におけるDCNタンパク質を、GAPDHに対する相対的発現 (Relative expression) の値で評価した。

30

## 【0065】

図3に示すように、Mock細胞株と比較し、shDCN細胞株では有意にDCNのmRNA量およびタンパク質量の低下が観察された。確実にDCN発現抑制が行われている安定細胞株を用いて以降の実験を行った。

40

## 【0066】

まず、DCN shRNAを導入したことによる細胞増殖能の変化の有無を確認した。shDCN細胞株を細胞数  $1 \times 10^5 / 1\text{ml}$  培地 /  $3\text{cm}^2$  ディッシュとなるように播種し、5-FUの存在下または非存在下で24時間 ~ 120時間培養した。その後、トリプシン処理し、細胞数を計測した。コントロールにはMock細胞株を用いた。

## 【0067】

図4に示すように、計測を行った全期間を通してshDCN導入による細胞増殖能に有意な差は認められなかった。

## 【0068】

50

次に、shDCN細胞株およびMock細胞株を抗癌剤の存在下で培養することにより、DCN発現抑制による抗癌剤への耐性度変化を、細胞増殖能の変化を測定することにより検証した。抗癌剤として5-FUを使用した。

【0069】

shDCN細胞株およびMock細胞株は、細胞数 $2 \times 10^3 / 100 \mu\text{l}$ 培地/ウエルの割合で96ウエルプレートに播種し、同時に5-FUを添加した培地 $10 \mu\text{l}$ を混合した。5-FUの濃度は、最終濃度が $1 \mu\text{M} \sim 1 \times 10^4 \mu\text{M}$ になるよう調整した。その後、72時間インキュベーションし、細胞の生存率をMTSアッセイにて評価した。MTS溶液(Promega社製)を $10 \mu\text{l}$ /ウエルの割合で添加し、4時間インキュベートした後、プレートリーダーにて490nmの波長で計測した。MTSアッセイの結果から、50%生存濃度(IC50)を求めた。

10

【0070】

図5に示すように、shDCN細胞株はMock細胞株と比較し、約10倍低いIC50値を示した。このことから、shDCN細胞株では5-FUへの感受性が約10倍上昇したことが明らかになった。すなわち、DCNの発現抑制により、抗癌剤耐性細胞株の5-FUに対する耐性が低下したと考えることができる。

【実施例3】

【0071】

<DCN発現抑制と抗癌剤耐性度の低下(in vivo実験)>

DCN発現量と抗癌剤耐性度の関連について、DCN発現抑制細胞由来腫瘍を移植したヌードマウス(近交系BALB/cヌードマウス:チャールズリバー社製)を使用したin vivo実験系を用いて検討した。動物実験に際しては、カナダ動物管理協会(Canadian Council on Animal Care、CCAC)の基準に準じて行った。マウスは全例メスで、4週齢で購入し6週齢より実験に使用した。

20

【0072】

接種した細胞株は抗癌剤耐性細胞株Sa-3R株およびKB-R株、並びにそれらのshDCN細胞株およびMock細胞株であり、いずれも細胞数 $1 \times 10^7 / 200 \mu\text{l}$ となるようにリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に希釈した細胞懸濁液を、29G針(マイジェクター:TERUMO社製)を用いてマウスの背部に皮下注射した。腫瘍を接種したマウスを3日ごとに観察し、腫瘍体積が $100 \sim 300 \text{mm}^3$ になったものを実験群とした。腫瘍体積の評価は、腫瘍の長径および短径を測定し、次式で計算することにより行った: $(\text{長径} \times \text{短径}^2) / 2$ 。

30

【0073】

抗癌剤としてS-1を使用した。S-1の経口投与は、Sa-3R株およびKB-R株、並びにそれらのMock細胞株およびshDCN細胞株を接種したマウス対し、 $2 \text{mg} / \text{kg} / \text{day}$ の濃度で連続14日間行った。実験期間中、飼料・水分の摂取制限はしていない。S-1投与およびDCN発現抑制によるマウスに対する毒性評価として、体重増減を観察した。マウスの体重測定は腫瘍径測定時に行った。

【0074】

図6に動物実験の結果を示した。S-1非投与群では、Sa-3R株およびKB-R株、並びにそれらのMock細胞株およびshDCN細胞株に由来する腫瘍はいずれも同様の腫瘍増殖を示した。また、S-1を経口投与した場合、Mock細胞株由来腫瘍は、Mock細胞株が5-FUに対して耐性を有するため、S-1非投与群の各細胞株に由来する腫瘍とほぼ同様の腫瘍増殖を示した。一方、S-1を経口投与した場合、shDCN細胞株由来腫瘍では、前述の4種類の腫瘍と比較して腫瘍体積の有意な減少を認めた。

40

【0075】

図7は実験を行ったマウスの体重の推移を示す。S-1投与およびDCN発現抑制による体重増減の有意な変化は認められなかった。

【0076】

上記結果から、shDCN細胞株に由来する腫瘍ではS-1への感受性が増加したこと

50

が *in vivo* の実験系で明らかになった。すなわち、DCNの発現抑制により、抗癌剤耐性細胞株に由来する腫瘍のS-1に対する耐性が低下したと考えることができる。

【0077】

< DCN発現抑制細胞由来腫瘍の免疫組織学的特徴 >

ヌードマウスに移植したDCN発現抑制細胞およびコントロール細胞由来腫瘍の病理組織切片を作製し、免疫組織化学染色を行った。免疫組織学的染色では、ホルマリンで固定されたパラフィン包埋組織を厚さ4 μmの切片にし、脱パラフィン処理と脱水処理した後、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と30分間反応させて内因性ペルオキシダーゼを除去し、さらに1.5%ブロッキング血清(Santa Cruz Biotechnology社製)で処理することにより非特異的なタンパク質との反応を阻害した。その後、1:50倍希釈したPCNAポリクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology社製)、1:500倍希釈した抗AKTポリクローナル抗体(ROCK LAND社製)、1:50倍希釈した抗p-AKT(ser473)ポリクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology社製)を4 にて湿潤状態で16時間反応させた。リン酸緩衝液で3回洗浄し、エンビジョン試薬(Envision reagent、Dako社製)と反応させた後、3,3-ジアミノベンジジン テトラヒドロクロライド(3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride、Dako社製)によって発色させ検出した。最後に、対比のためのヘマトキシリン染色を施した。また、TUNEL染色キット(TaKaRa社製)にてアポトーシスの確認を行った。

10

20

【0078】

免疫組織学的染色における染色性の評価にはIHCスコアを用いた。IHCスコアは、対物レンズ40倍で観察し、1視野の中の全細胞数のうち陽性細胞の百分率と染色性の強度とを掛け合わせた数の総和である。染色性の強度は、例えば3段階、すなわち弱、中、強に評価して、それぞれに1~3の整数を割り当てることにより数値化する。これを無作為に抽出した10視野で行い、その平均値としてIHCスコアを算出する。IHCスコアは、染色強度と染色範囲を示す優れたスコアとして、現在、一般的に用いられている染色度判定方法である。

【0079】

図8にTUNEL染色の結果を示す。shDCN細胞由来腫瘍を接種し、S-1を経口投与したマウス(shDCN・S-1(+))の腫瘍組織切片では、他のコントロール群、すなわちshDCN細胞由来腫瘍を接種したS-1非投与マウス(shDCN・S-1(-))や、Mock細胞株を接種したS-1投与したマウスおよびS-1非投与マウス(それぞれMock・S-1(+))およびMock・S-1(-))の腫瘍組織切片と比較してアポトーシスの割合が高い傾向が観察された。

30

【0080】

図9にPCNA染色の結果を示す。shDCN・S-1(+))群において、他のコントロール群(shDCN・S-1(-)、Mock・S-1(-)、Mock・S-1(+))と比較して、細胞増殖の割合が低い傾向が認められた。

【0081】

図10にAKT染色の結果を示す。S-1投与群および非投与群の間で、AKT発現に差は認められなかった。

40

【0082】

図11にp-AKT染色の結果を示す。shDCN・S-1(+))群において、他のコントロール群(shDCN・S-1(-)、Mock・S-1(-)、Mock・S-1(+))と比較して、リン酸化AKT量が減少している傾向が観察された。

【0083】

図12は、AKTとリン酸化AKTのIHCスコアを示す。IHCスコアは図10と図11から算出した。shDCN・S-1(+))群において、リン酸化AKTのIHCスコアが有意に低下していた。

50

## 【0084】

以上のデータから、DCNの発現を抑制し、さらにS-1を投与すると、AKTのリン酸化が阻害され、アポトーシスが促進されることが示唆された。

## 【実施例4】

## 【0085】

<臨床検体におけるDCN発現とS-1奏効度との関連>

臨床検体におけるDCN発現とS-1奏効度との関連を検証した。本実施例において、患者からの生物学的試料の採取は全て、インフォームドコンセントを行ってその意思確認した後に実施したものである。

## 【0086】

臨床検体は、化学療法施行前に生検で採取された組織標本であり、生検後にS-1投与が行われた頭頸部癌患者16症例の組織標本を用いた。臨床検体の内訳は、S-1投与の奏効群7例と非奏効群(SD/PD症例)9例である。なお、これらの症例は患者背景をそろえた症例を抽出し検討に供した。奏効群は、術前補助化学療法としてのS-1投与後に完全寛解した症例(Complete Response症例、以下CR症例と称する)を意味する。非奏効群は、術前補助化学療法としてのS-1投与後に一定の効果は見られたものの効果の持続は見られなかった安定症例(Stable Disease症例、以下SD症例と称する)、および進行した症例(Progress Disease症例、以下PD症例と称する)を意味する。

## 【0087】

まず、*in vivo*でのDCN発現を確認するため、臨床検体を用いて、免疫組織学的染色によりDCN発現状態を調べた。免疫組織学的染色は、1:50倍希釈した抗ヒトDCNラビットポリクローナル抗体(Santa Cruz社製)を用いて、実施例3に記載の方法と同様の手順で切片を処理することにより実施した。DCNの発現はIHCスコアにより数値化し、マンホイットニーのU検定(Mann-Whitney's U test)で統計学的に解析した。

## 【0088】

図13に、上記16症例の臨床検体についてDCNの免疫組織学的染色を施行した結果の代表例、並びにCR症例およびSD/PD症例のIHCスコアの分布を示す。S-1投与が奏効したCR症例ではDCNの発現が弱いのに対し、S-1の効果ที่ไม่十分であったSD/PD症例ではDCNの発現亢進を認めた。また、SD/PD症例におけるDCNのIHCスコアは、CR症例のIHCスコアと比較して有意に高かった( $P = 0.006$ )。

## 【0089】

上記結果から、癌患者の生検試料におけるDCN発現とS-1投与の奏効度とが相関していることが判明した。

## 【0090】

次にS-1投与の奏効度について客観的な評価尺度を求めるために、CR症例、SD/PD症例についてIHCスコアの結果からカットオフ値を算出した。カットオフ値の算出には様々な手法があるが、今回はROC曲線(Receiver Operating Characteristic Curve)を用いる手法を使用した。ROC曲線は、診断検査の有用性を検討する手法として利用されており、閾値を変化させていった場合に、それぞれの閾値における感度(Sensitivity)を縦軸に、FPF(False Positive Fraction、偽陽性率:1-特異度(Specificity))を横軸にプロットした曲線である。ROC曲線では、全く診断能のない検査は、対角線上の直線となるが、診断能が向上するほど、対角線が左上方に弧を描くような曲線となり、診断能100%の検査は、左辺-上辺上を通る曲線となる。

## 【0091】

CR症例群およびSD/PD症例群の臨床検体のIHCスコアから求めたROC曲線を図14に示した。IHCスコアとS-1投与の奏効度との関連については、ROC曲線に

10

20

30

40

50

おける曲線下面積 (area under the curve、AUCと略称される) で評価され、通常0.5 - 1.0の値をとる。今回の結果ではAUC = 0.889であった。一般的には、AUCは予測能や診断能の判断指標として使用され、3段階で評価される。すなわち、予測能や診断能は、AUCが0.5 - 0.7の場合は低く、0.7 - 0.9の場合は中程度であり、0.9 - 1.0の場合は高いと評価される。したがって、今回の結果における2群間のIHCスコアによる予測診断能は比較的高いことがわかった。

【0092】

今回用いたROC曲線をもとにカットオフ値を算出するため、感度と特異度のバランスから便宜的にカットオフ値を求める2種類の手法を用いた。

【0093】

第1の方法は、感度と特異度の優れた診断能の高いROC曲線は、左上隅に近づいていくという事実から、この左上隅との距離が最小となる点をカットオフ値に設定する方法である。図14に示したROC曲線のグラフ左上隅の点より、曲線まで最も近いポイントを曲線から求めると、IHCスコアのカットオフ値は119であり、この時の感度は0.889、特異度は0.833(偽陽性率0.167)となった。

【0094】

第2の方法は、これと反対の発想に基づく手法であり、最も予測・診断能が低いとされるROC曲線、すなわちAUC = 0.500となる斜点線から最も離れたポイントをカットオフ値にする方法である。つまり、(感度 + 特異度 - 1)を計算して、その最大値となるポイントをカットオフ値にするという方法であり、このポイントをヨーデン指標 (Youden index) と呼ぶ。図15に示したヨーデン指標より第2の手法で求めたIHCスコアのカットオフ値は119、この時の感度は0.889、特異度は0.833(偽陽性率0.167)となり、第1の手法と同様の結果となった。

【0095】

上記結果より、DCN発現より求めたIHCスコアのカットオフ値、具体的にはカットオフ値119を用いることで、生検試料のDCN発現状態からS-1投与に対する感受性を高確率に予見が可能であると示唆された。

【0096】

実施例1~3に示したように、抗癌剤耐性細胞株および担癌マウスを用いた実験系による検証から、DCN発現が抗癌剤耐性に深く関与していることが見出され、さらに生検試料を用いてDCNの発現状態を解析することにより、S-1投与前にS-1感受性の判断が可能であることが示された。

【産業上の利用可能性】

【0097】

本発明は、癌患者においてS-1による化学療法を施行する前に、その癌細胞が該化学療法に対して耐性かまたは感受性かを判定するものであり、臨床検査薬産業、試薬産業、医療機器産業への利用が可能である。

【配列表フリーテキスト】

【0098】

配列番号1: ヒトデコリン遺伝子

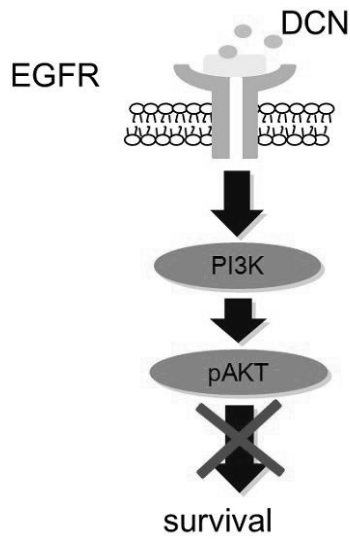
10

20

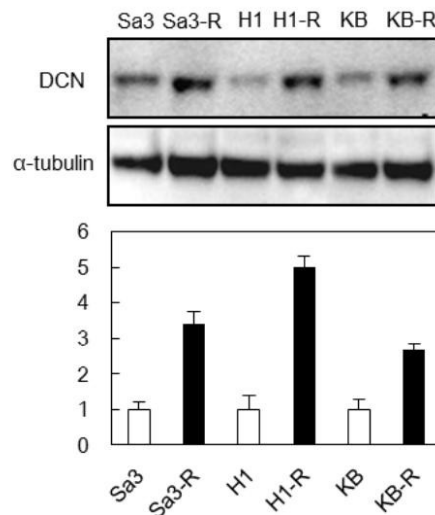
30

40

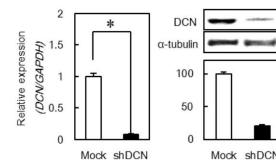
【 図 1 】



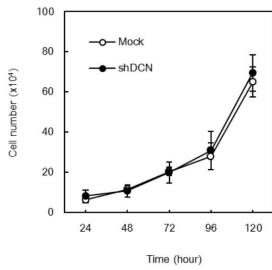
【 図 2 】



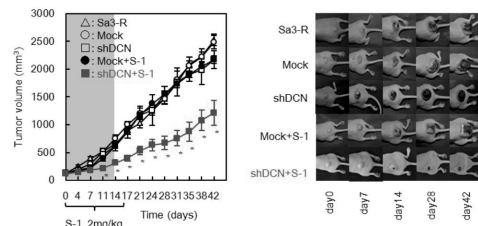
【 図 3 】



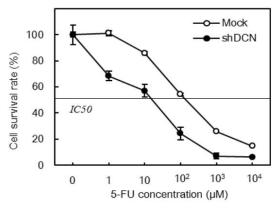
【 図 4 】



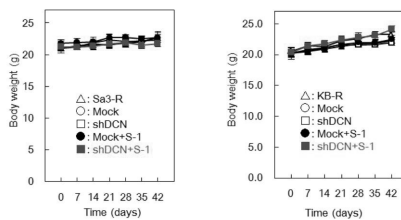
【 図 6 】



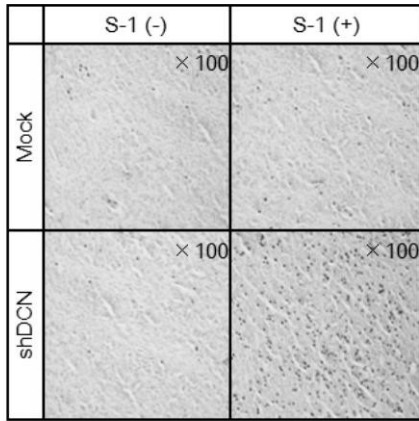
【 図 5 】



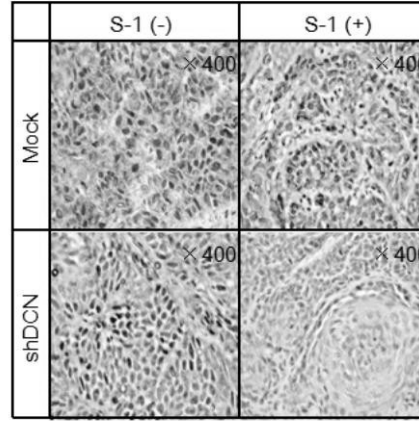
【 図 7 】



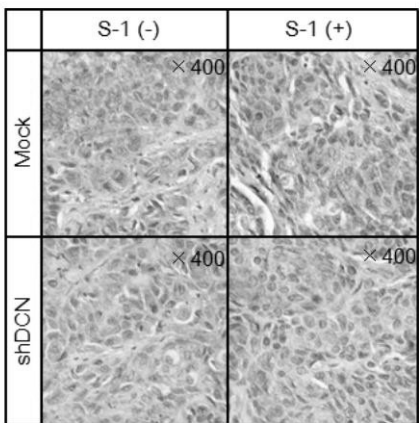
【 8 】



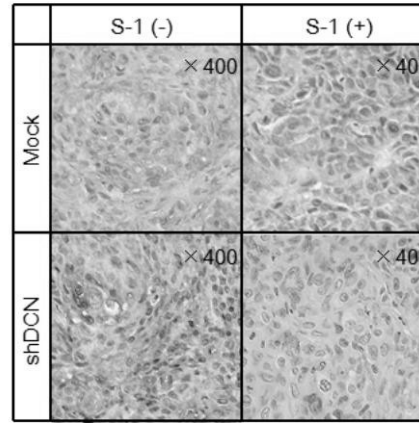
【 9 】



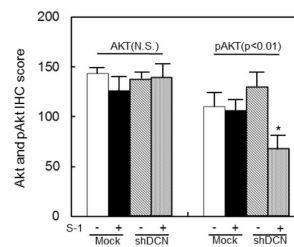
【 1 0 】



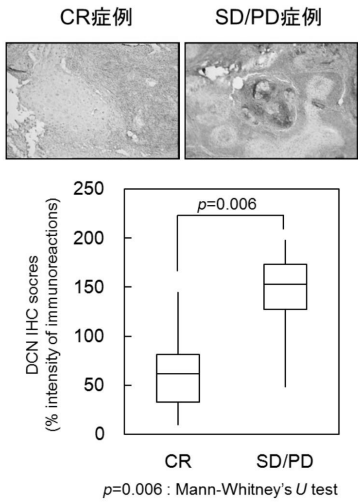
【 1 1 】



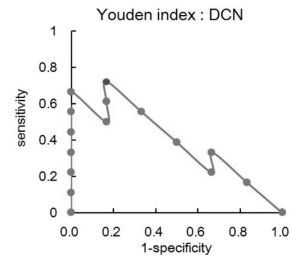
【 1 2 】



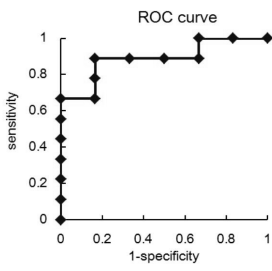
【 図 1 3 】



【 図 1 5 】



【 図 1 4 】



【 配列表 】

0006175711000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 A  
 C 1 2 N 15/00 A

(72)発明者 笠松 厚志  
 千葉県千葉市中央区亥鼻 1 丁目 8 番 1 号 国立大学法人千葉大学大学院 医学研究院内  
 (72)発明者 鶴澤 一弘  
 千葉県千葉市中央区亥鼻 1 丁目 8 番 1 号 国立大学法人千葉大学大学院 医学研究院内

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 Pierre Farmer et al. , A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer , nature medicine , 2 0 0 9 年 , vol. 15, no. 1 , PP.68-74  
 Hidetaka Yokoe et al. , Neoadjuvant Chemotherapy with S-1 for Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma , Journal of Cancer Science & Therapy , 2 0 1 0 年 , vol. 2, No. 5 , PP. 132-135  
 Yukio Yamano et al. , Identification of cisplatin-resistance related genes in head and neck squamous cell carcinoma , Int. J. Cancer , 2 0 1 0 年 , vol. 126 , PP.437-449

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)  
 G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8  
 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 )  
 C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S ( S T N )