

シスプラチンの抗悪性腫瘍効果を 予測する方法の開発

大分大学医学部分子病理学講座
助教 塚本 善之

2021年9月28日

技術背景:なぜ抗癌剤の効果予測が必要か？

現在の癌化学療法

臓器別にもっとも有効と考えられている標準治療が決められている。しかし、同じ臓器癌・同じ標準治療でも効果は患者によって異なっており、腫瘍抑制効果が得られないにもかかわらず、きつい副作用に苦しむ患者も少なくない

投与前効果予測により期待される点

- ✓ 抗腫瘍効果の増強と副作用の低減
- ✓ 治療期間の短縮
- ✓ 患者QOL向上、医療費の削減

効果予測のための従来技術① 「遺伝子パネル検査」(保険適用)

遺伝子異常をバイオマーカーとする効果予測法



114 mutation・amplification (whole exon)				12 fusion genes	
ABL1	CRKL	IDH2	NF1	RAC2	ALK
ACTN4	CREBBP	IGF1R	NFE2L2/Nr2	RAD51C	AKT2
AKT1	CTNNB1/b-catenin	IGF2	NOTCH1	RAF1/CRAF	BRAF
AKT2	CUL3	IL7R	NOTCH2	RB1	ERBB4
AKT3	DDR2	JAK1	NOTCH3	RET	FGFR2
ALK	EGFR	JAK2	NRAS	RHOA	FGFR3
APC	ENO1	JAK3	NRG1	ROS1	NRG1
AFAP	EP300	KDM5A/UTX	NTRK1	SETBP1	NTRK1
ARID1A	ERBB2	ERBB3	NRX2	NRX2	NRX2
ARID1B	ERBB4	ERBB4	NRX1	NRX1	NRX1
ATM	ERBB4	ERBB4	NRX1	NRX1	NRX1
AUN1	ERBB4	ERBB4	NRX1	NRX1	NRX1
AVL	ERBB4	ERBB4	NRX1	NRX1	NRX1
BAP1	ERBB4	ERBB4	NRX1	NRX1	NRX1
BARD1	ERBB4	ERBB4	NRX1	NRX1	NRX1
BCL2L1/BIM	ERBB4	ERBB4	NRX1	NRX1	NRX1
BFAF	ERBB4	ERBB4	NRX1	NRX1	NRX1
BICA1	ERBB4	ERBB4	NRX1	NRX1	NRX1
BICA2	ERBB4	ERBB4	NRX1	NRX1	NRX1
CND1	ERBB4	ERBB4	NRX1	NRX1	NRX1
CD274/PD-L1	ERBB4	ERBB4	NRX1	NRX1	NRX1
CDK4	ERBB4	ERBB4	NRX1	NRX1	NRX1
CDKN2A	ERBB4	ERBB4	NRX1	NRX1	NRX1
CHER2	ERBB4	ERBB4	NRX1	NRX1	NRX1
	IDH1	MYCN	RAC1		

100以上の癌関連遺伝子の
ゲノム異常を一度に解析

↓
異常遺伝子を標的とした
分子標的薬を選択

1. 治療効果が期待される医薬品の選択
2. 未承認医薬品の治療効果予測
3. 免疫チェックポイント阻害剤の治療効果予測
4. がん種の診断
5. 予後に係る情報の入手
6. 原発不明がんのがん種の特特定
7. 再発がんの診断
8. 重複がんの診断
9. 薬剤耐性獲得がんの治療法の選択
10. 遺伝性腫瘍の診療手法の選択

(国立がん研究センター HP)

効果予測のための従来技術① 「遺伝子パネル検査」(保険適用)

遺伝子異常をバイオマーカーとする効果予測法

メリット

100以上のがん関連遺伝子を一度に解析
候補薬が見つかった場合、高い効果が期待される

デメリット

適切な候補薬につながる可能性が低い

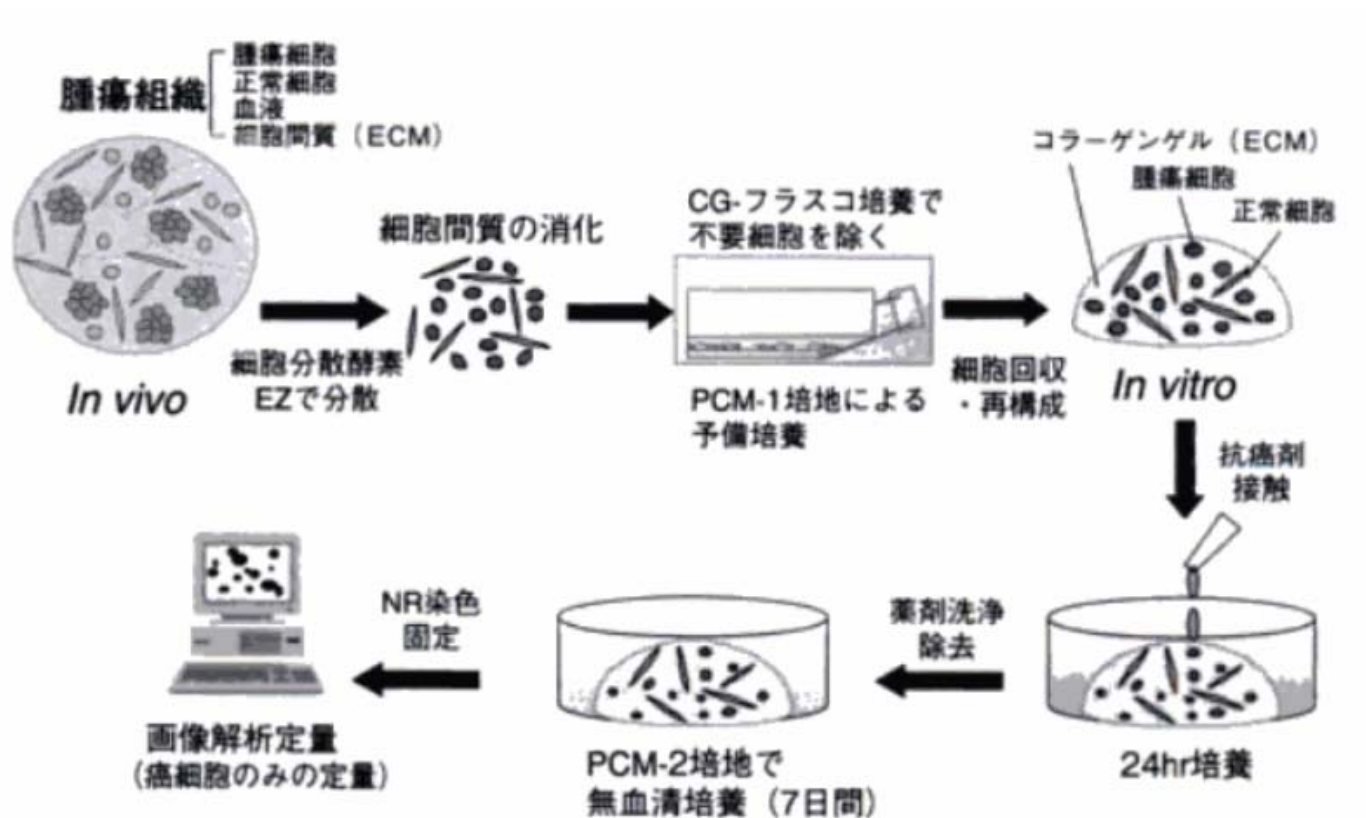
➡ 現状は10%程度

候補はほぼ分子標的薬のみ

➡ シスプラチン、5-フルオロウラシル、ドセタキセルなど
細胞障害性抗癌剤は候補に挙がらない

効果予測のための従来技術② 「抗腫瘍剤感受性検査」(保険適用)

患者癌組織を培養し、抗癌剤で処理して生存率を測定する



(CMC出版, 2007年「動物実験代替のためのバイオマテリアル・デバイス」)

効果予測のための従来技術② 「抗腫瘍剤感受性検査」(保険適用)

患者癌組織を培養し、抗癌剤で処理して生存率を測定する

メリット

バイオマーカーが必要無い。予測精度が高い
幅広い抗癌剤(細胞障害性抗癌剤を含む)に適応

デメリット

必要組織量が多く(300mg程度)、手術検体が中心となる
→ 再発・転移による手術不能となった癌に対して、
検査の実施が困難

これからの効果予測に求められる技術

遺伝子異常では予測困難な抗癌剤の効果予測

➡ 細胞障害性抗癌剤、2分子同時阻害剤など

少量の組織検体で診断が可能

➡ 再発・転移により手術不応となった患者では、抗癌剤が治療の中心となる。このような患者からは外科切除検体は得られない。

そのため、内視鏡や針生検などで得られる少量の組織(10-20mg)からの効果予測が望ましい

新技術の特徴

- ✓ 細胞障害性抗癌剤の1つであるシスプラチンについて、独自のバイオマーカーで効果予測。
- ✓ 癌組織を培養し、診断材料として用いる。

メリット

遺伝子異常では予測困難なシスプラチンの効果予測が可能
少量の内視鏡的生検組織材料で効果予測が可能

デメリット

シスプラチンのみの効果予測

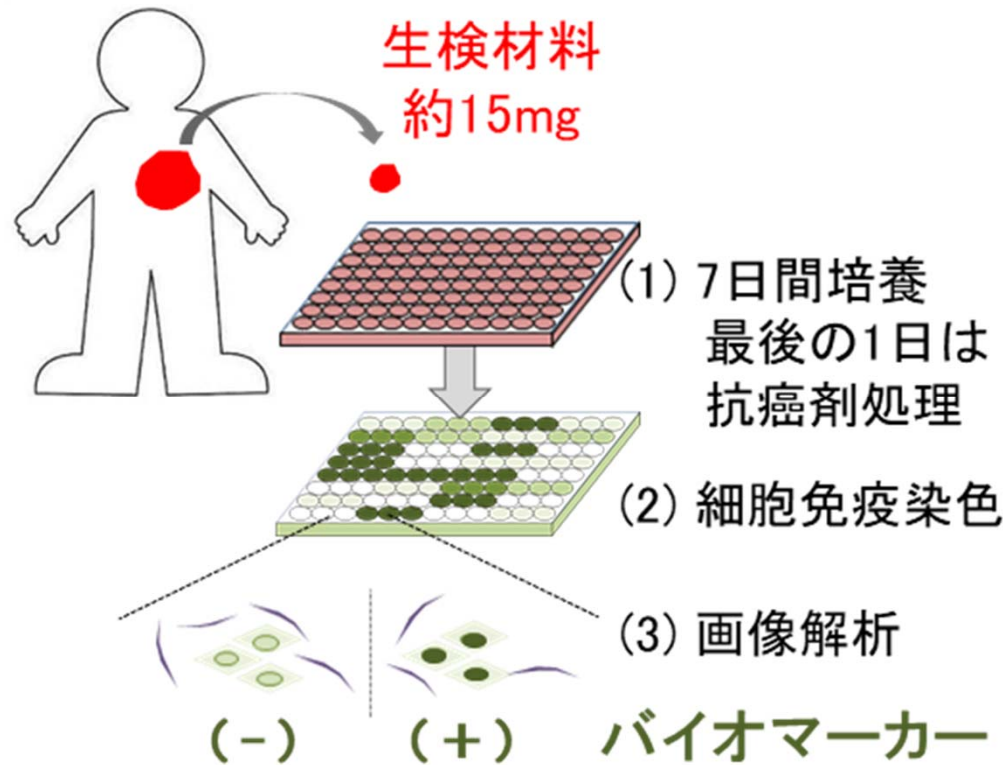
➡ 他の抗癌剤についても現在バイオマーカー探索中

培養および免疫染色の操作が入る

➡ 自動化可能

新技術を含む最終製品の概念図

「マルチ抗癌剤感受性試験キット(6-8剤を対象)」



癌組織培養は一般的手法による
(癌オルガノイドなど)

**独自のバイオマーカーを用いた
検出方法(新技術)**

(1) 培養用試薬キット

- プレート
- 酵素
- 培地
- マトリゲル
- 抗癌剤

(2) 細胞免疫染色用試薬キット

- 固定液
- 洗浄液
- 抗体
- 発色試薬

(3) 自動化システム

培地交換、細胞染色、画像解析の過程を自動化。例えば、Biomek i7 (ベックマン・コールター社)など。

技術背景：対象とする抗癌剤

遺伝子異常による効果予測が難しい抗癌剤。
まずはシスプラチン。他の抗癌剤も併せて製品化を目指す。

シスプラチンについて

- ✓ 細胞障害性抗癌剤の1つ。DNAと結合することでゲノムの複製を阻害し、細胞死を引き起こす
- ✓ 多くの癌腫（口腔、食道、胃、大腸、肺、卵巣、精巣など）の標準治療で第一選択薬として使われる抗癌剤。
- ✓ 治療効果や副作用（腎障害・嘔吐・吐き気など）が患者間で大きく異なる
- ✓ 遺伝子異常による効果予測が難しい

患者由来の癌組織培養はIn vitro癌モデルとして創薬・診断の分野で広く応用されている(知財対象外)

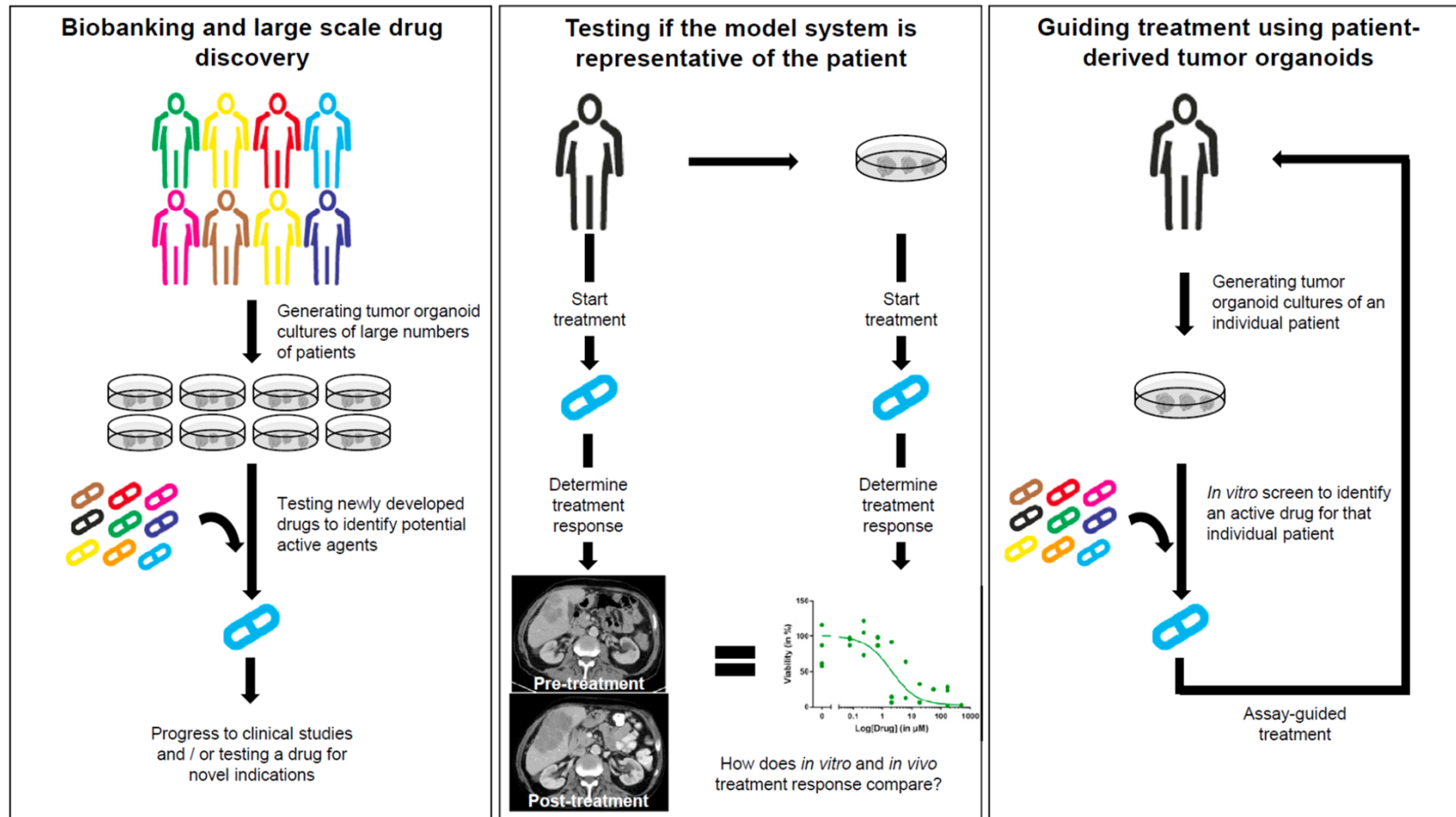
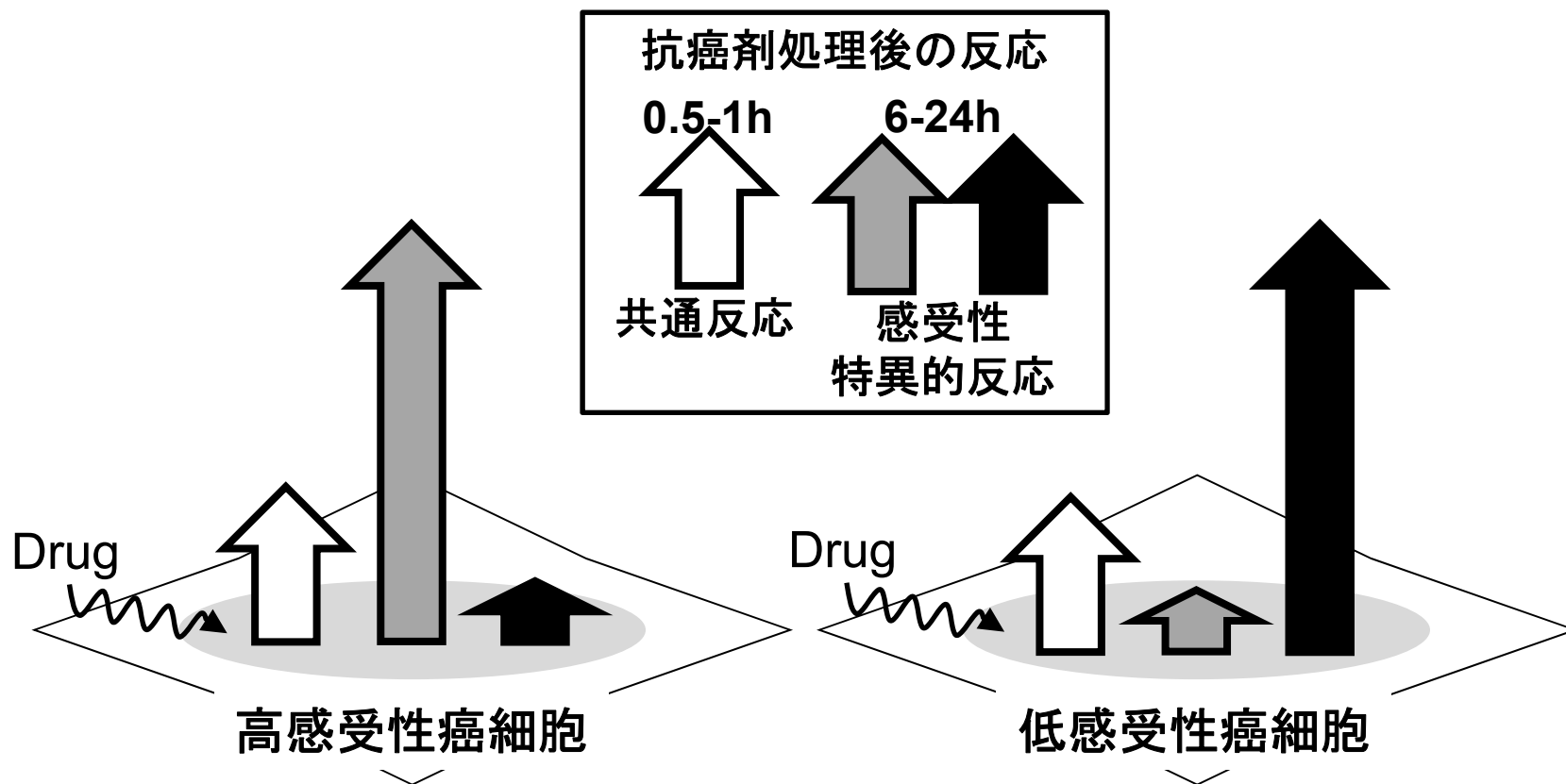


Figure 1. Patient-Derived Tumor Organoids and their Applications

This figure summarizes the potential of patient-derived tumor organoids. Because of their high culture take rate, they can be used to establish large and well-characterized biobanks that comprise the entire spectrum of molecular subtypes per tumor type. This can facilitate large-scale drug screening efforts. Furthermore, organoids lend themselves for a drug-sensitivity comparison with the individual patient responses because of their high take rates. Finally, patient-derived tumor organoids have the potential to select therapy for the individual patient if there are no regular treatment options left.

(Weeber et al, Cell Chem Biol 2017 [Tumor Organoids as a Pre-clinical Cancer Model for Drug Discovery])

抗癌剤処理後に感受性と相関して変化するタンパク質リン酸化を
バイオマーカーとして応用



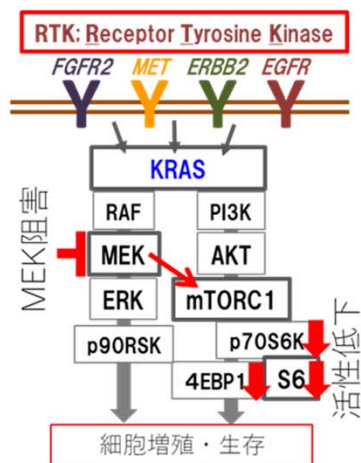
これまでのバイオマーカーは固定された組織材料のゲノム異常や、ある時点での遺伝子発現といった、「静的」な材料であることが多かった。新技術では生きた組織材料における感受性と相関する「動的」な因子をバイオマーカーとして応用する

抗癌剤処理後に変化するタンパク質リン酸化をバイオマーカーとして応用

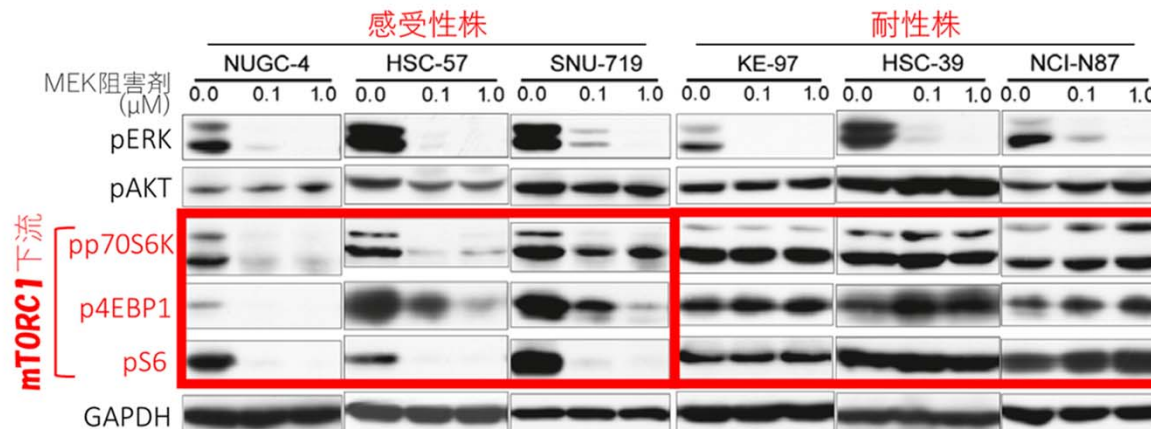
報告例) MEK阻害剤の効果予測マーカーとして「リン酸化S6の減少」を同定

(Hirashita and Tsukamoto et al, Cancer Sci, 2016)

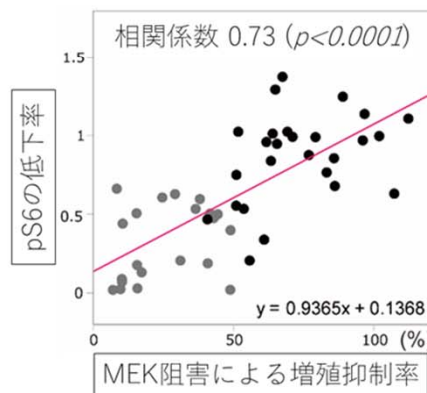
(A)



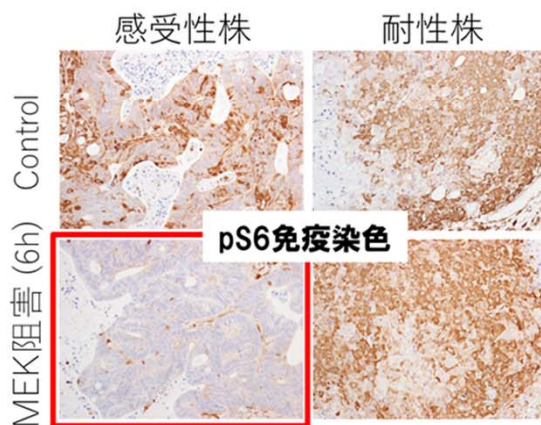
(B)



(C)



(D)



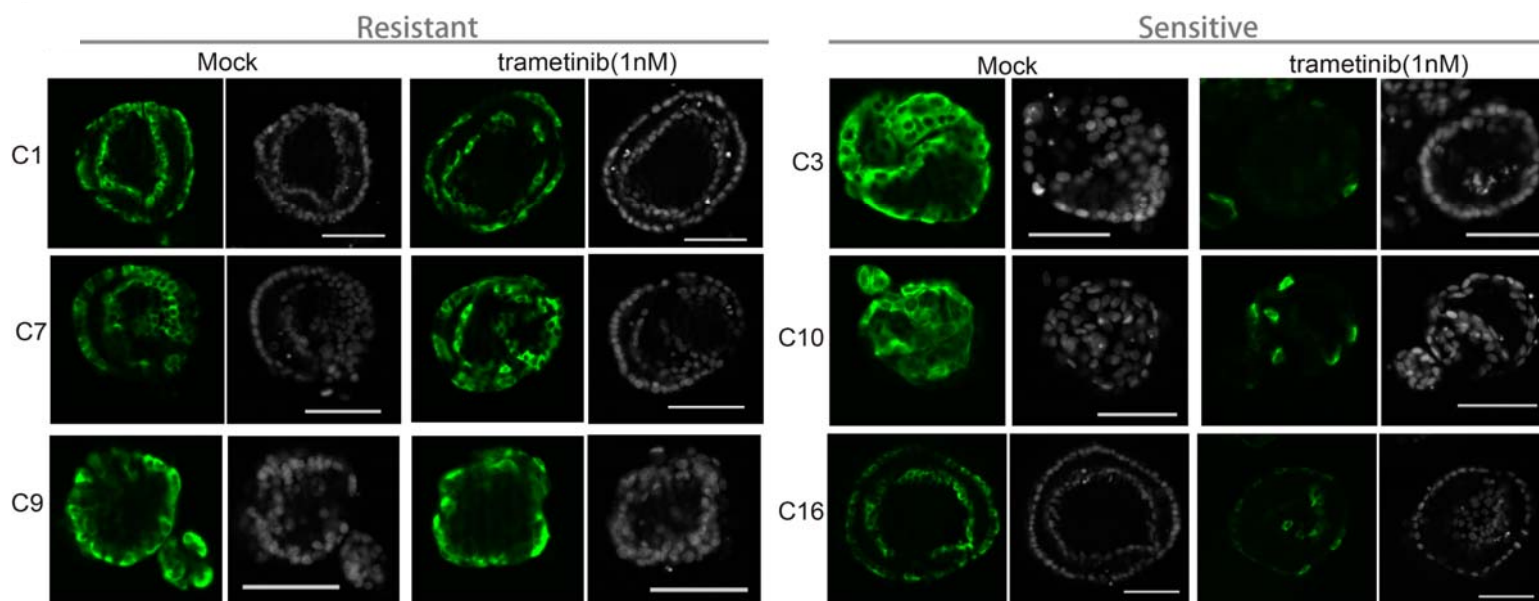
細胞株48株を使って
バイオマーカーを同定

抗癌剤処理後に変化するタンパク質リン酸化をバイオマーカーとして応用

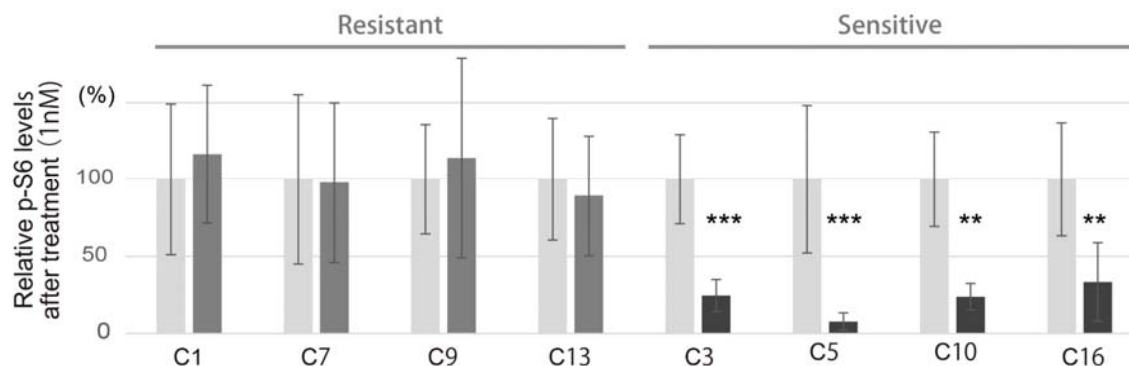
報告例) MEK阻害剤の効果予測マーカーとして「リン酸化S6の減少」を同定

(Hirashita and Tsukamoto et al, Lab Invest, 2021)

細胞染色で検出可能

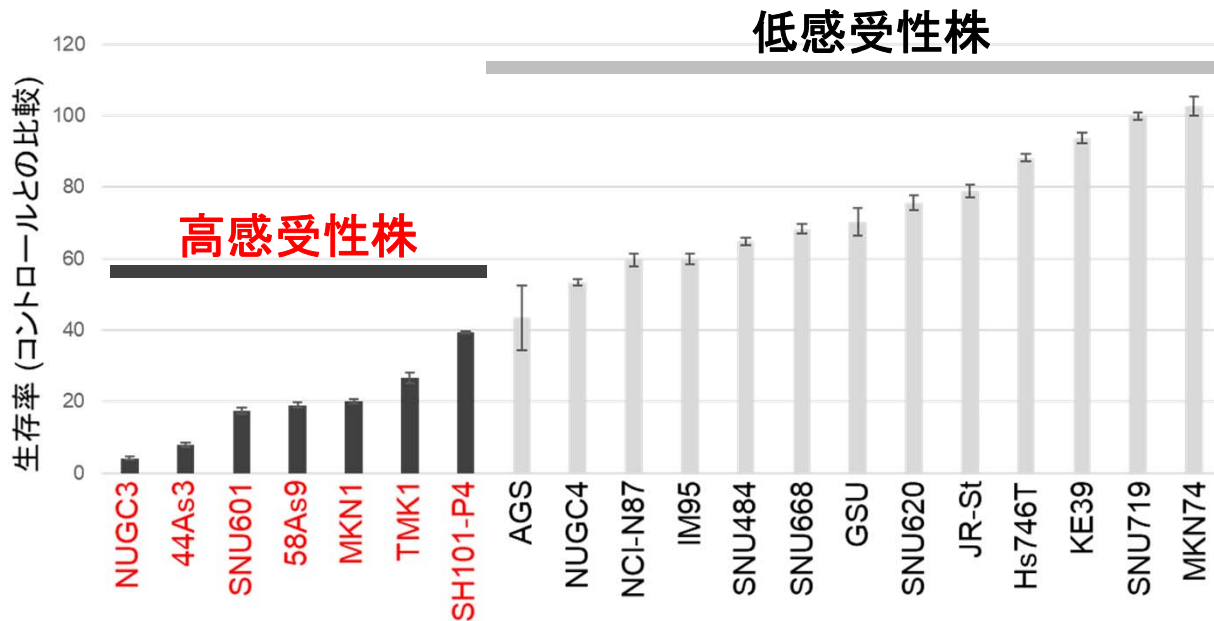


数値化判定

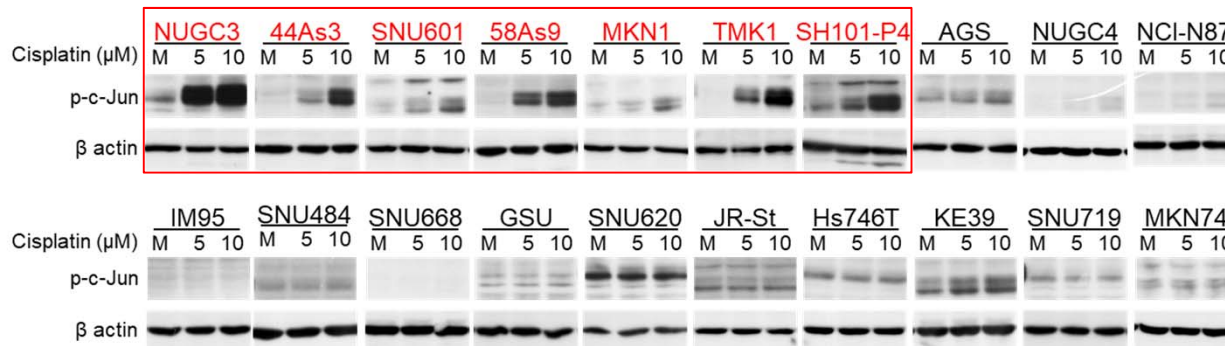


大腸癌患者由来組織培養を使った効果判定

シスプラチン効果予測バイオマーカー；シスプラチン処理後のc-Junリン酸化誘導

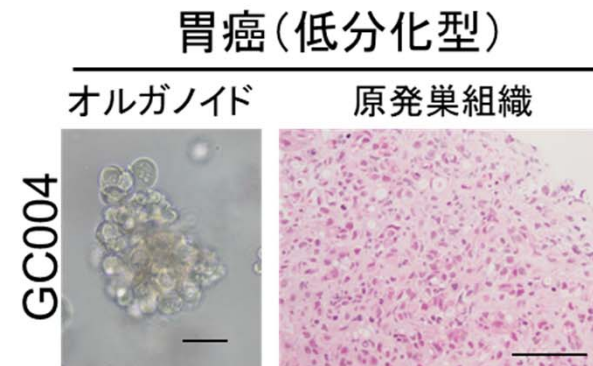
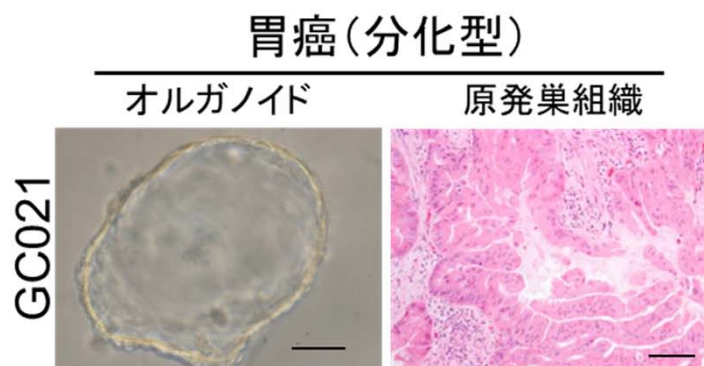
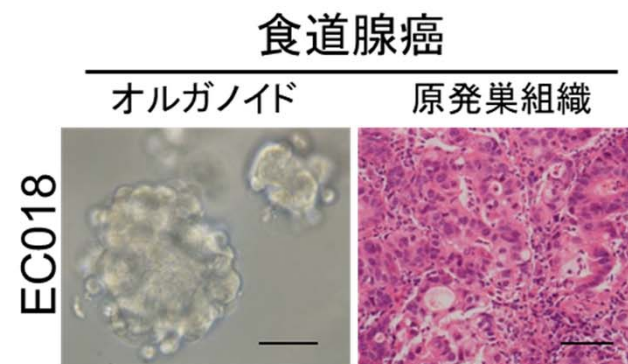
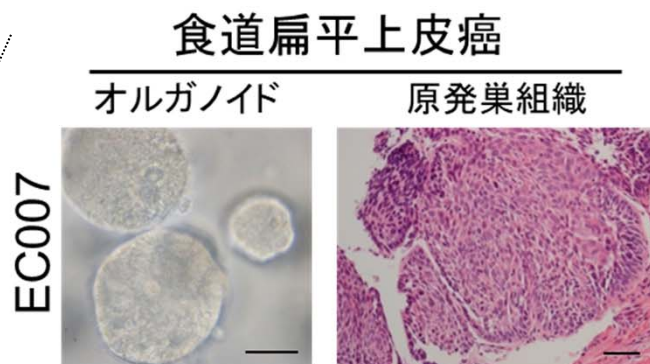
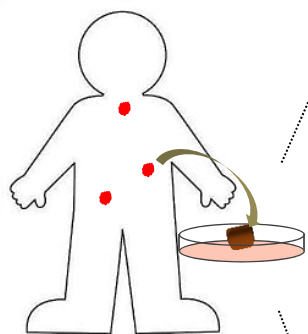


5 μ M シスプラチン、3日処理後の細胞株の生存率。細胞株を感受性によって分類。赤字が高感受性株



シスプラチンで24時間処理後、バイオマーカー(c-Junのリン酸化、p-c-Jun)をウェスタンブロット法で検出。

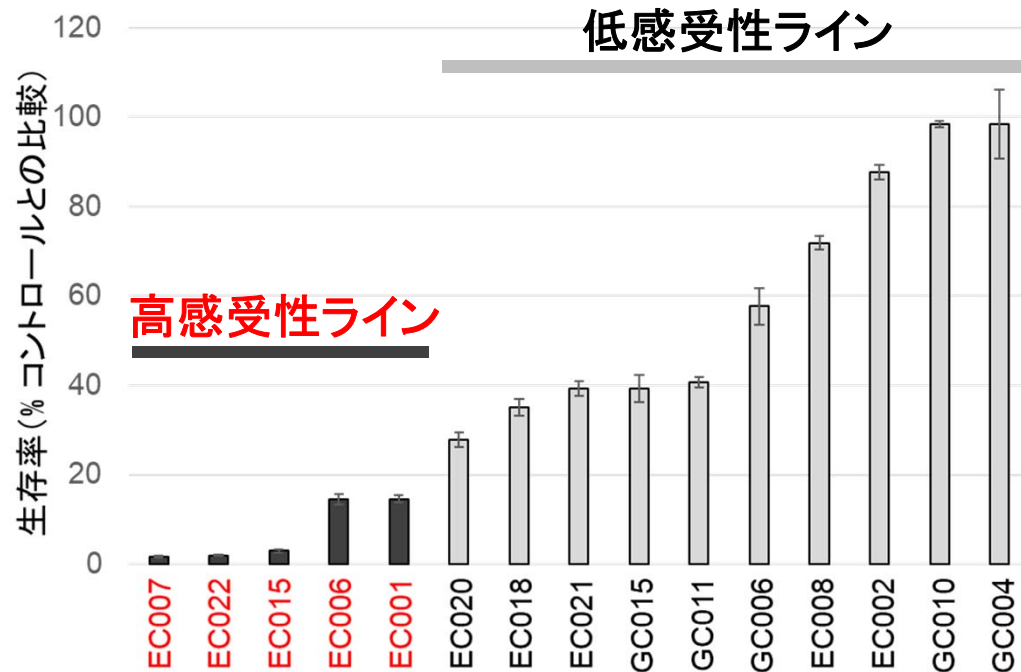
高感受性株(赤字)のみでp-c-Junが増加していることがわかる



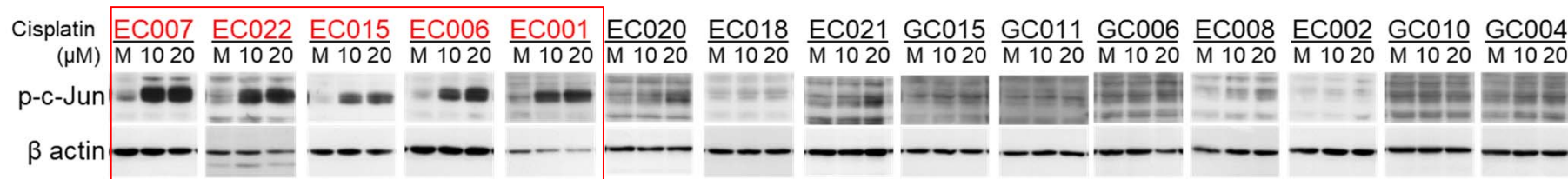
作製された癌組織培養は、由来する
原発巣組織と組織・形態的に類似し
ている。

既報に従って、食道・胃・大腸癌由来組織培養を作製

シスプラチン効果予測バイオマーカー；シスプラチン処理後のc-Junリン酸化誘導

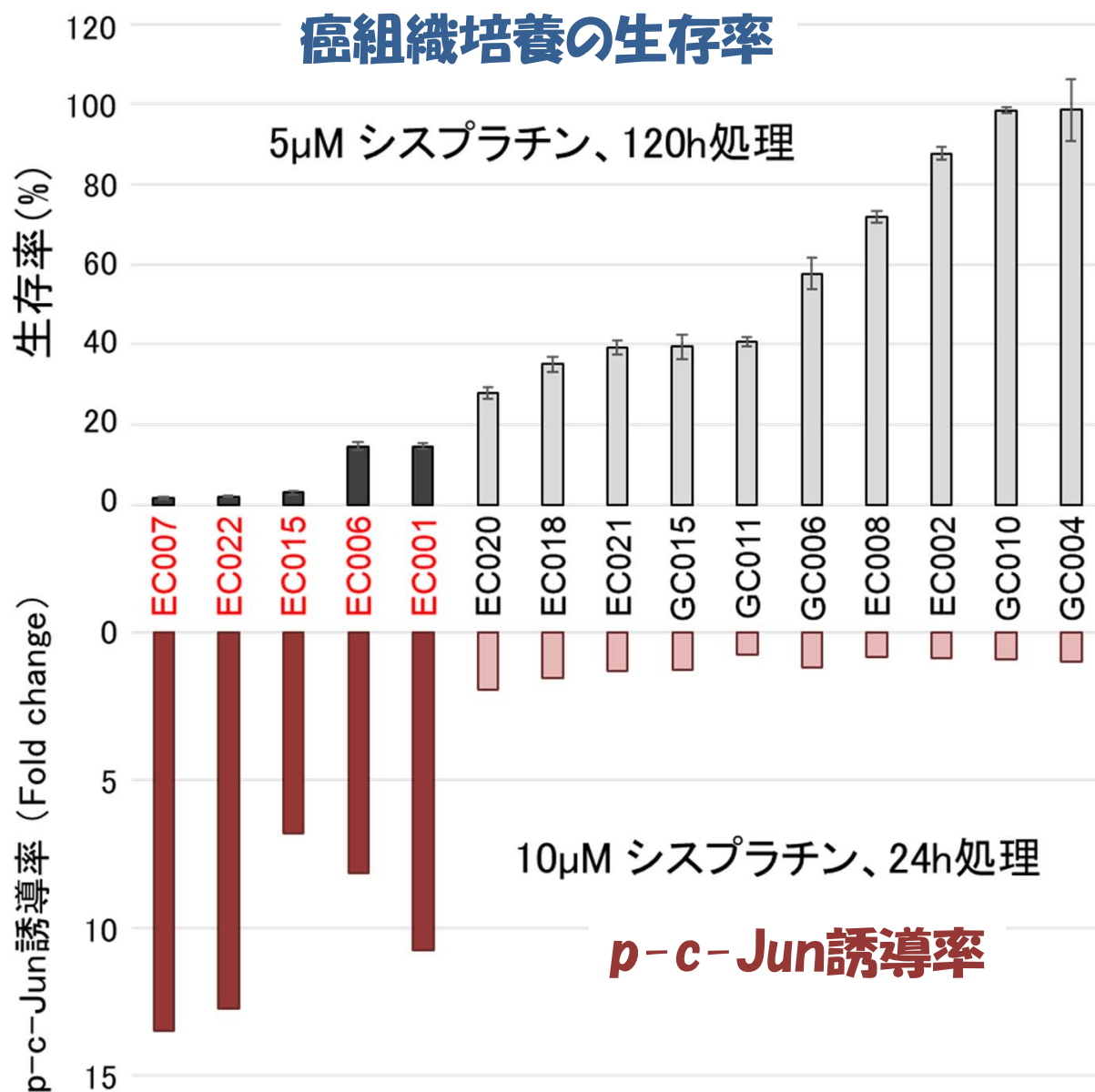


5 μ M シスプラチン、5日処理後の癌組織培養の生存率。細胞株を感受性によって分類。赤字が高感受性株



シスプラチンで24時間処理後、バイオマーカー(c-Junのリン酸化、p-c-Jun)をウェスタンブロット法で検出。高感受性株(赤字)のみでp-c-Junが誘導。

シスプラチン効果予測バイオマーカー；シスプラチン処理後のc-Junリン酸化誘導



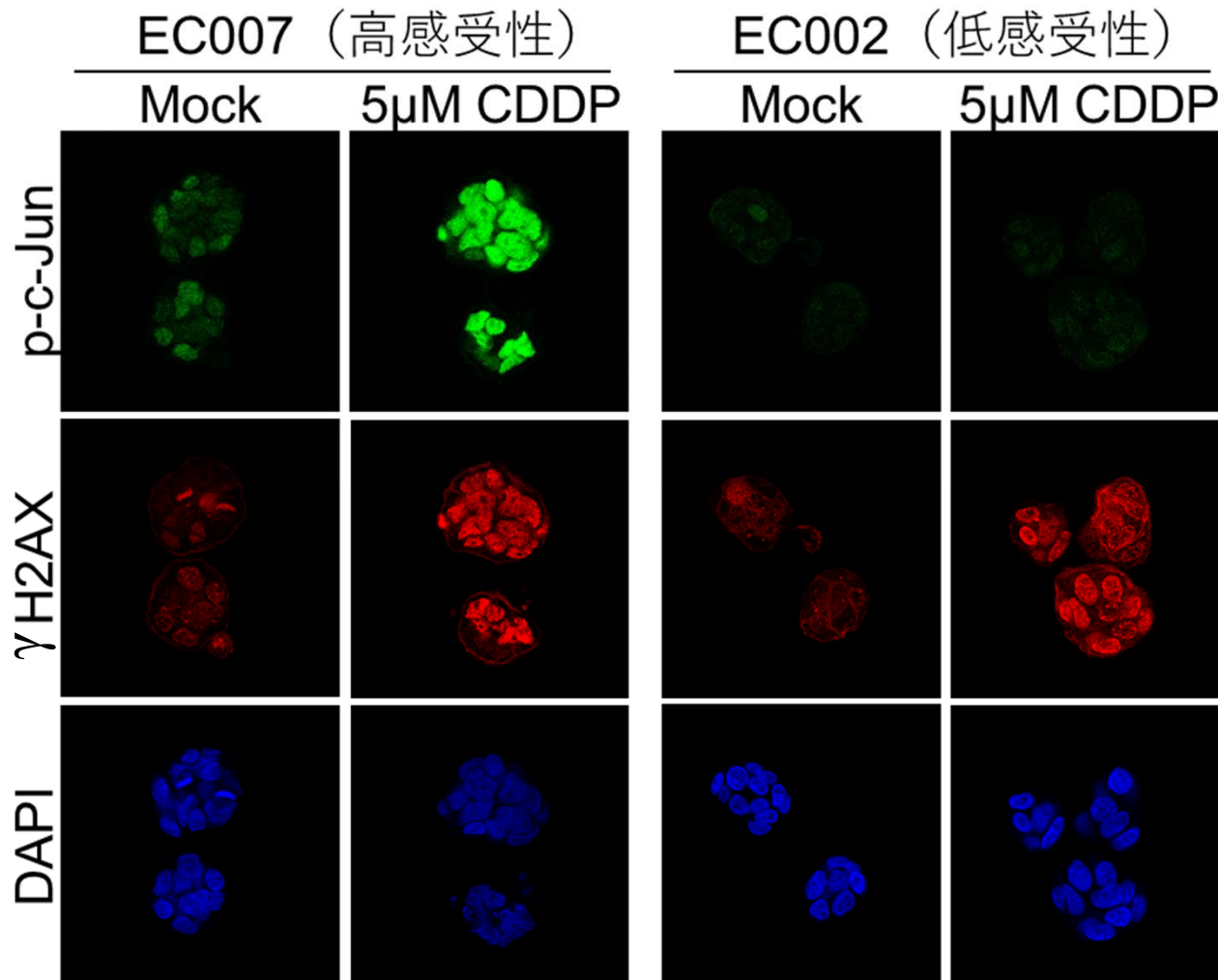
ウェスタンブロット法によるp-c-Junの誘導率を数値化し、シスプラチンへの感受性と比較した。

シスプラチン処理後の生存率(120h)とp-c-Jun誘導率(24h)が有意に相関

$$\text{Pearson's } r = -0.751$$

$$p = 0.0012$$

シスプラチン効果予測バイオマーカー; シスプラチン処理後のc-Junリン酸化誘導



高感受性におけるp-c-Junの誘導は免疫染色でも検出可能

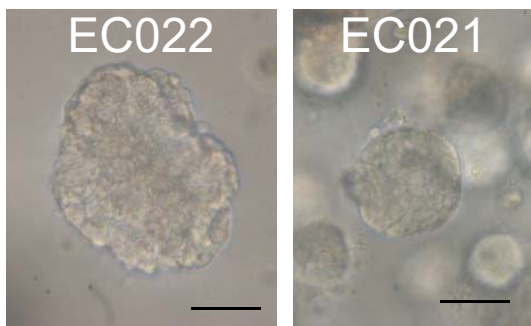
→ 少量の細胞で検出できる。

→ 必要最低組織量を削減できる

γ H2AX (DNA障害マーカー) が亢進していることから、低感受性でもシスプラチンが細胞内に取り込まれていることがわかる。しかし、感受性とは相関しない。

シスプラチン効果予測バイオマーカー; シスプラチン処理後のc-Junリン酸化誘導

癌組織培養

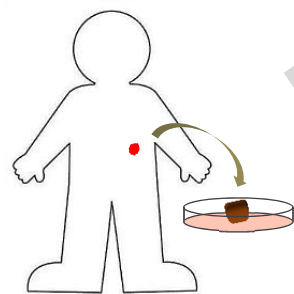


新技術による効果予測



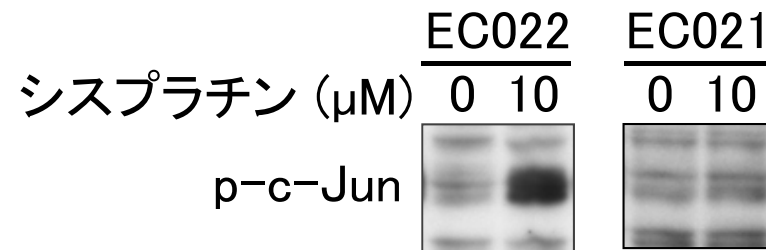
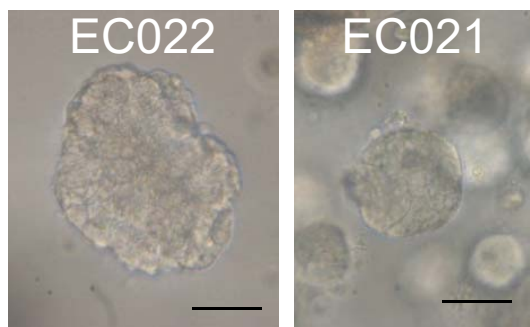
食道癌術前化学療法
(ドセタキセル、シスプラチン、5FU)

PET/CTによる
治療効果の評価

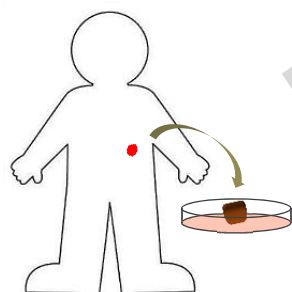


シスプラチン効果予測バイオマーカー；シスプラチン処理後のc-Junリン酸化誘導

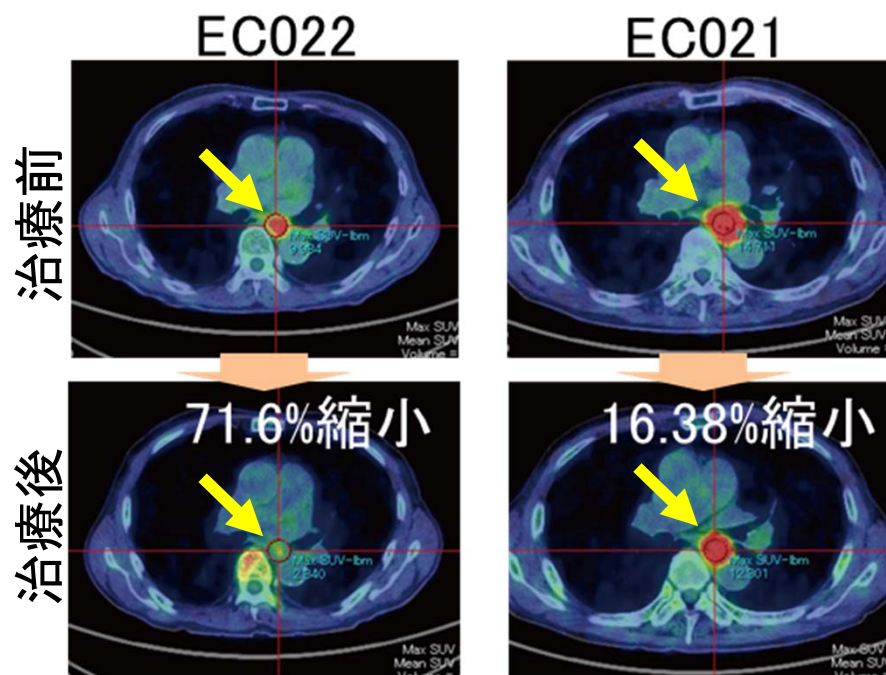
癌組織培養



シスプラチン処理後、EC022のみで
p-c-Junが強く誘導された

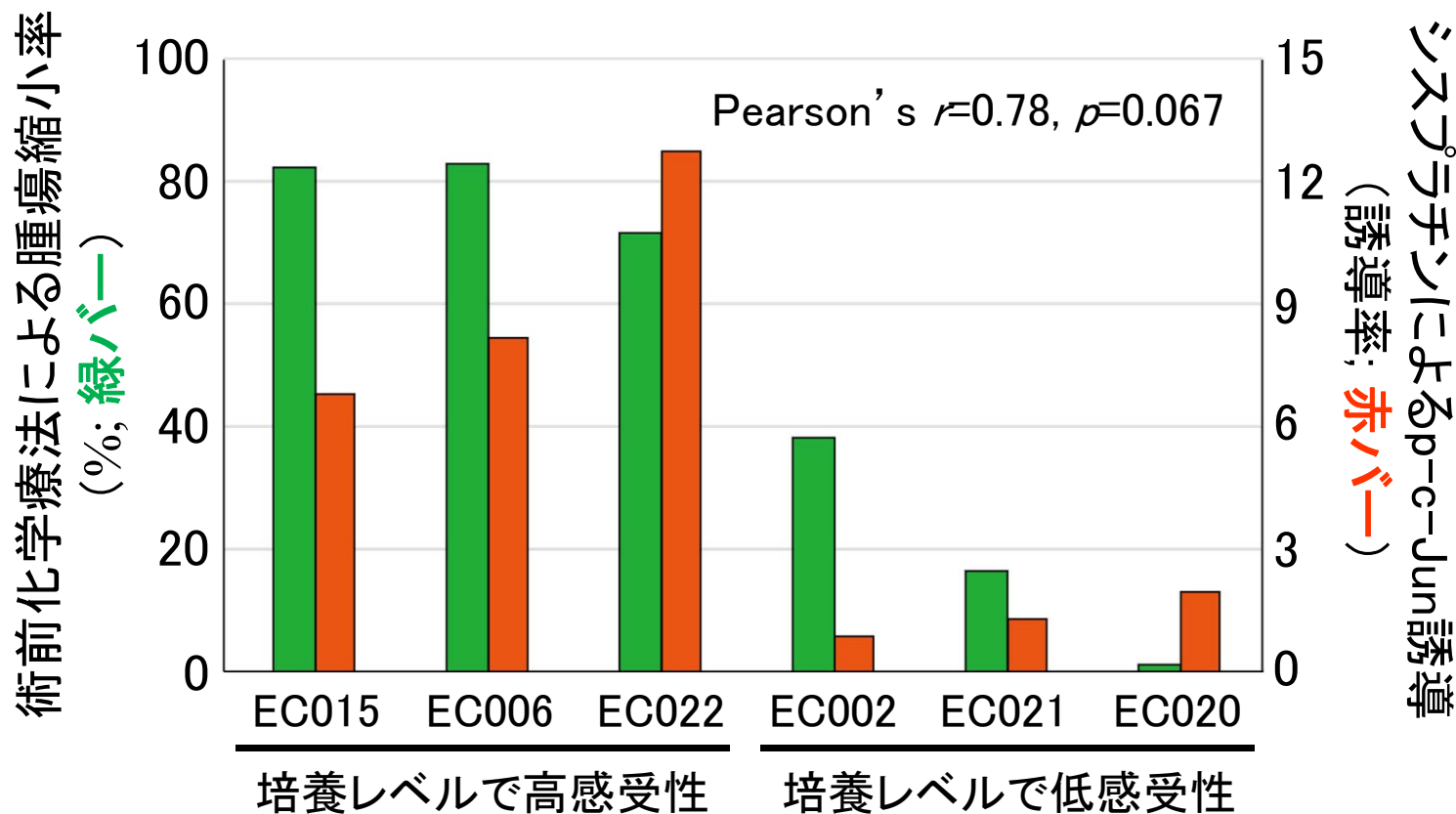


食道癌術前化学療法
(ドセタキセル、シスプラチン、5FU)



EC022で腫瘍縮小率が大きく、治療効果が高い

シスプラチン効果予測バイオマーカー；シスプラチン処理後のc-Junリン酸化誘導



培養レベルでのシスプラチン処理後のp-c-Jun誘導率が術前化学療法による腫瘍縮小率と相関する傾向が認められた ($p=0.067$)。

今後の方針

遺伝子異常による効果予測が難しい抗癌剤

MEK阻害剤 シスプラチン drug A drug B drug C drug D drug E drug F

組織培養(20ライン)
による感受性解析

✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓

バイオマーカーの同定

✓ ✓

バイオマーカー検出法

✓ ✓

特許出願 ✕ (論文済)

✓

企業への導出

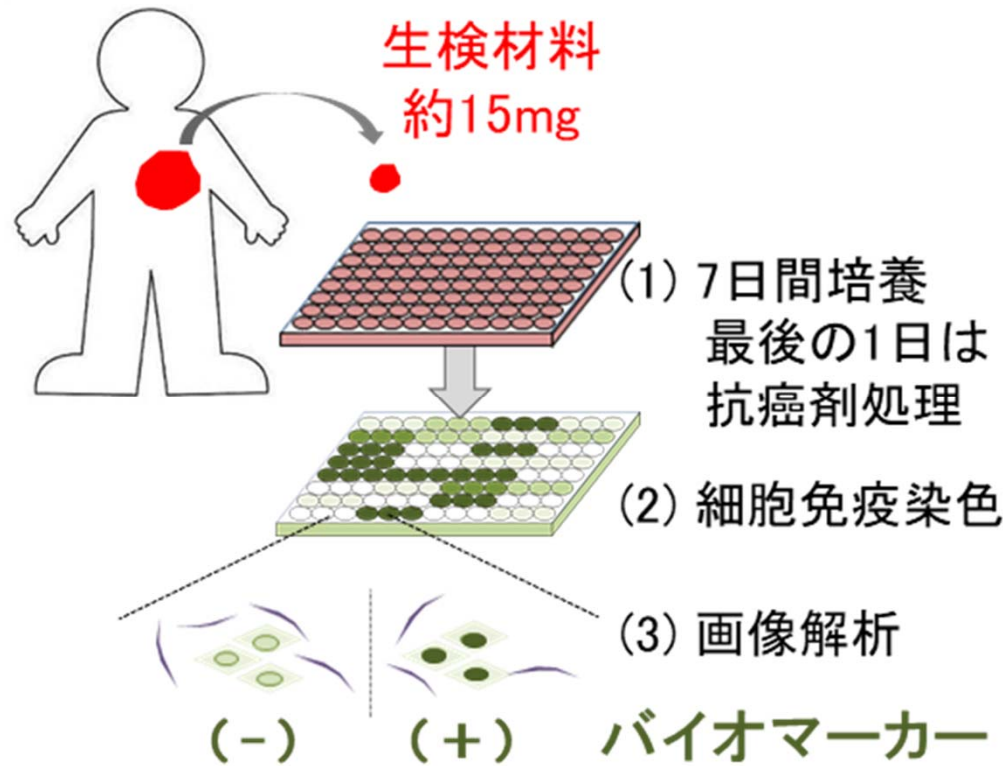
「マルチ抗癌剤感受性試験キット(6-8剤を対象)」
体外診断用医薬品

目標とする最終製品

- ✓ 遺伝子異常では予測困難な抗癌剤の効果を予測
- ✓ 検査目的で採取された少量(10-20mg)の組織を使用
- ✓ 培養、免疫染色の過程(全作業の8割)を自動化

新技術を含む最終製品の概念図

「マルチ抗癌剤感受性試験キット(6-8剤を対象)」



癌組織培養は一般的手法による
(癌オルガノイドなど)

**独自のバイオマーカーを用いた
検出方法(新技術)**

(1) 培養用試薬キット

- プレート
- 酵素
- 培地
- マトリゲル
- 抗癌剤

(2) 細胞免疫染色用試薬キット

- 固定液
- 洗浄液
- 抗体
- 発色試薬

(3) 自動化システム

培地交換、細胞染色、画像解析の過程を自動化。例えば、Biomek i7 (ベックマン・コールター社)など。

これまでの取り組み

<論文報告・特許出願>

Cancer Sci 2016, 責任著者
MEK阻害剤の感受性予測
バイオマーカーについて報告

Development 2017, 第2著者
癌組織培養の応用研究

特願2020-143512
シスプラチン治療効果予測法の開発

Lab Invest, 2021, 責任著者
癌組織培養と新規バイオマーカー
による新しい診断法の提案

<助成金獲得状況>

JSPS国際共同研究強化(2016-17)
(Hans Clevers labで癌組織培養を学ぶ)

JSPS基盤研究(B)(2018-20)
癌組織培養と新規バイオマーカー
による新しい診断方法の開発

JSPS基盤研究(B)(2021-24)
新規バイオマーカーとプロテオミクス
による新しい診断方法の開発

AMEDシーズA(九州大学拠点)(2021)
遺伝子異常による効果予測が困難な
抗癌剤の新規効果予測
バイオマーカーの探索

2016

2017

2018

2019

2020

2021

企業への期待

まだ基礎技術開発の段階だが、開発の要となるバイオマーカー探索は順調。
「製品化するために基礎研究段階でどのようなデータを収集すべきか？」を
 意識することでスムーズな製品化研究につなげたい。

製品化へ向けた基礎研究段階からのプランニングのサポート

➡ 製品化研究・設計開発のために、基礎研究の段階で評価方法
 (サンプル数、検出方法など)の確立を共同で行い、協力して
 製品化に必要な実証データを収集していきたい。

独自に開発した(もしくは開発中の)抗癌剤をお持ちの企業様へ

➡ 新規バイオマーカーによる感受性予測法を共同開発しませんか？
 抗癌剤作用機序・耐性メカニズムの解明にもつながります。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 癌治療効果の有効性を予測する方法、予測装置及び予測プログラム
- 出願番号 : 特願2020-143512
- 出願人 : 国立大学法人大分大学
- 発明者 : 塚本善之

問い合わせ先

国立大学法人大分大学

研究推進部 産学連携課 外部資金・知的財産係

TEL 097-554-8517

FAX 097-554-7740

e-mail chizai@oita-u.ac.jp