(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		
G01N 33/68	(2006.01)	G01N	33/68	ZNA
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	P
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	V
G01N 33/48	(2006.01)	G01N	33/48	P
C12Q 1/68	(2006.01)	G01N	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)
(22)出願日　平成25年3月29日(2013.3.29)
(65)公開番号　特開2013-242298(P2013-242298A)
(43)公開日　平成25年12月5日(2013.12.5)
審査請求日　平成28年3月23日(2016.3.23)
(31)優先権主張番号　特願2012-100681(P2012-100681)
(32)優先日　平成24年4月26日(2012.4.26)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

（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、独創的シーズ展開事業「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

(73)特許権者　304021831
国立大学法人　千葉大学
千葉県千葉市稲毛区弥生町１番３３号
(74)代理人　100088904
弁理士　庄司　隆
(74)代理人　100124453
弁理士　資延　由利子
(74)代理人　100135208
弁理士　大杉　卓也
(74)代理人　100152319
弁理士　曽我　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、テガフール、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

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頚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。
【請求項８】
Ｓ－１化学療法を施行する前に頭頚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（ＩＨＣ）により測定するステップａと、
ＩＨＣ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ＩＨＣスコアのカットオフ値として１１９を用い、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。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、テガフール、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。
【背景技術】
【０００２】
Ｓ－１は、テガフール、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。成分中のテガフールは、５－フルオロウラシル（以下、５－ＦＵ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－ＦＵの代謝酵素を選択的に阻害して５－ＦＵ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。
【０００３】
術前の単剤使用においてＳ－１により６１．２％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

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。

【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　ディジーズ－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。

【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。

【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）。

【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】

【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。
【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。
【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。
【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

した耐性細胞株（以下、ｓｈＤＣＮ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、ｓｈＤＣＮ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、ｓｈＤＣＮ細胞株では有意にリン酸化ＡＫＴ量の減少が認められたことから、ＤＣＮ発現抑制とＳ－１投与により、アポトーシスの誘導に関与する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判明した。このように、ＤＣＮ発現抑制と抗癌剤耐性の低下とが関連することをインビトロ（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）およびインビボ（ｉｎ　ｖｉｖｏ）の実験系で明らかにした。

【００１５】

さらに、臨床検体におけるＤＣＮ発現とＳ－１による奏効度とが相関することを見出した。

【００１６】

これら研究結果から、ＤＣＮ遺伝子がＳ－１耐性に関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。

【００１７】

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、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に関する。

【００１８】

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関する。

【００１９】

さらに本発明は、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前記Ｓ－１化学療法における投与効果判定方法に関する。

【００２０】

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関する。

【００２１】

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関する。

【００２２】

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関する。

【００２３】

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、ＤＣＮ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ＤＣＮ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関する。

【００２４】

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（ＩＨＣ）スコアのカットオフ値として１１９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関する。

【００２５】

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

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）

【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）
【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）
【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）
【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）
【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

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、テガフー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、テガフール、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、テガフー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。

【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。

【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。

【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。

【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】

測定対象の遺伝子産物であるタンパク質量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。

【００４２】

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、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（ハイブリドーマ細胞）を選別することにより作製できる。ハイブリドーマの作製は、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，「モレキュラークローニング　ア　ラボラトリーマニュアル」、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。

【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。

【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。

【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）、リアルタイムー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

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。

【００４７】

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３Ｄ－Ｇｅｎｅ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。

【００４８】

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×ＳＳＣ（０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０１５Ｍ　クエン酸ナトリウム）、０．１％の硫酸ドデシルナトリウム（ＳＤＳ）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て、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。

【００４９】

ＤＣＮ遺伝子に由来するｍＲＮＡやｃＤＮＡ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ｃＤＮＡ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、ＤＣＮ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ＤＣＮ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。

【００５０】

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ＤＣＮ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。

【００５１】

具体的には、上述したいずれかの方法によりＤＣＮ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ＤＣＮ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ＤＣＮ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。

【００５２】

ＤＣＮ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、ＩＨＣと略称することがある）や、免疫細胞化学染色（ＩＣＣ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。ＩＨＣおよびＩＣＣ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ＩＨＣ、細胞を使用するものをＩＣＣ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

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。

【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α－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の発現亢進を認めた。α－チューブリン発現に差は認められなかった。

【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。

【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　１．０μｇ／ｍｌ～１．５μｇ／ｍｌを含む選択培地中でセレクションを行い、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α－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。

【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。

【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1×10^{5}／１ｍｌ培地／３ｃｍ　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】

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２×１０^{3}／１００μｌ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１０μｌを混合した。５－ＦＵの濃度は、最終濃度が１μＭ～１×１０^{4}μＭ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１０μｌ／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。

【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。

【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１×１０^{7}／２００μｌ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１００～３００ｍｍ^{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：（長径×短径^{2}）／２。

【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、２ｍｇ／ｋｇ／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。

【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

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４μｍの切片にし、脱パラフィン処理と脱水処理した後、０．３％　H_2O_2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、エンヴィジョン試薬（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－ｄｉａｍｏｎｏｂｅｎｚｉｄｉｎｅ　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。

【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。

【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。

【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。

【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の効果が不十分であった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　ＯｐｅｒａｔｉｎｇＣｈａｒａｃｔｅｒｉｓｔｉｃ　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

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】

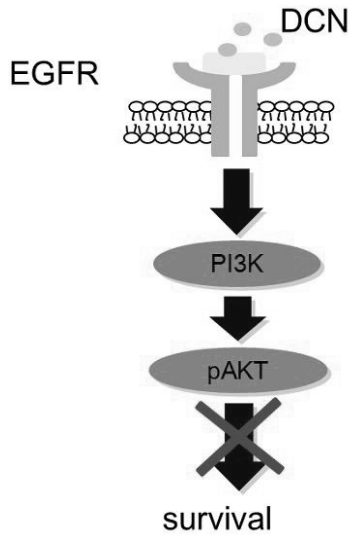
本発明は、癌患者においてＳ－１による化学療法を施行する前に、その癌細胞が該化学療法に対して耐性かまたは感受性かを判定するものであり、臨床検査薬産業、試薬産業、医療機器産業への利用が可能である。

【配列表フリーテキスト】

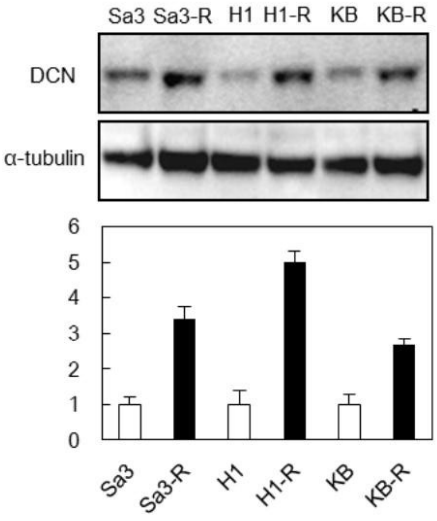
【００９８】

配列番号１：ヒトデコリン遺伝子

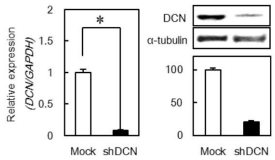
【図１】



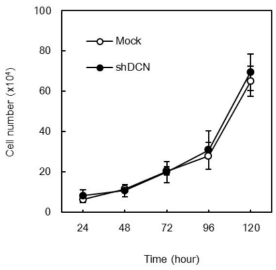
【図２】



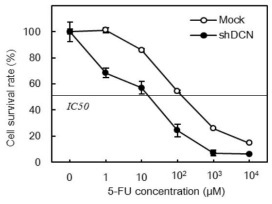
【図３】



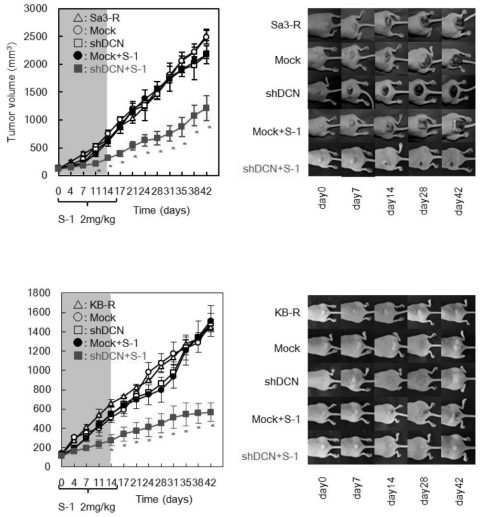
【図４】



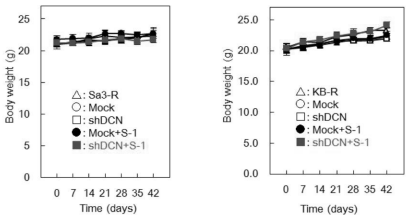
【図５】



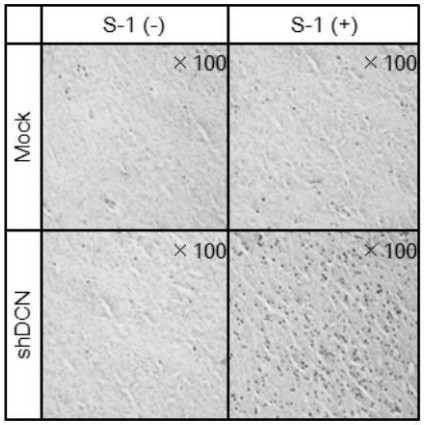
【図６】



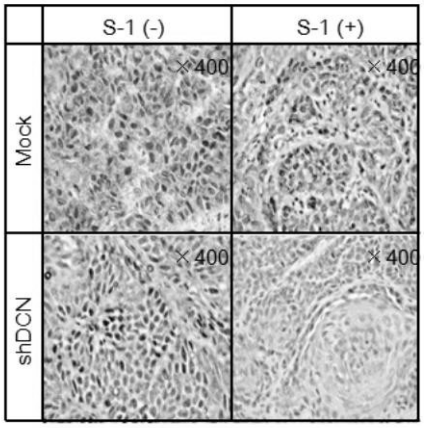
【図７】



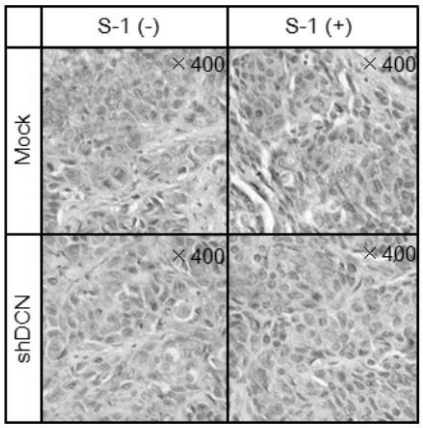
【図８】



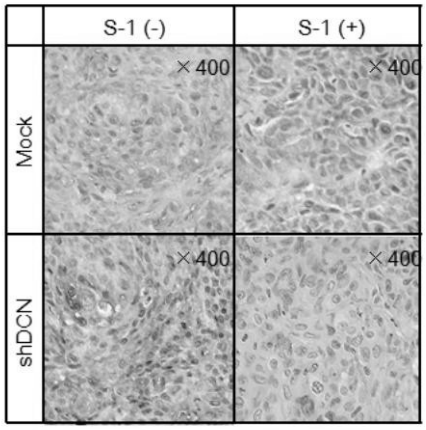
【図９】



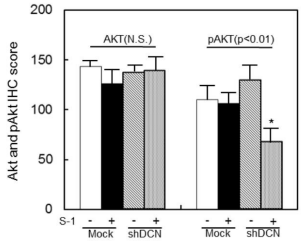
【図１０】



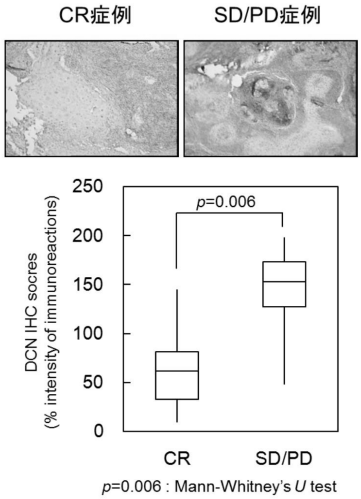
【図１１】



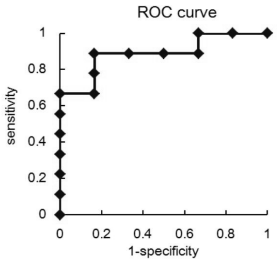
【図１２】



【図１３】



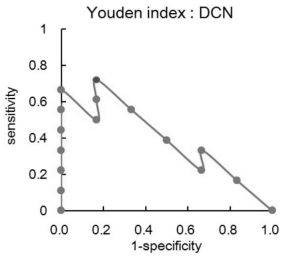
【図１４】



【配列表】

0006175711000001.app

【図１５】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I

C12N 15/09	*(2006.01)*	C12Q	1/68	A
		C12N	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 鵜澤 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, ２００９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, ２０１０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, ２０１０年, vol. 126, PP.437-449

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ ３３／４８－３３／９８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）

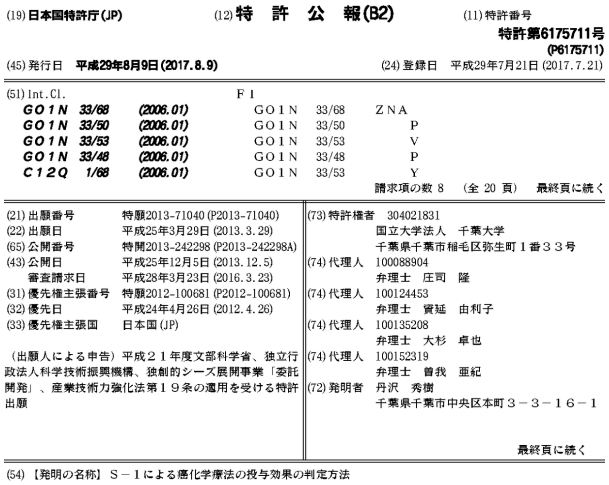
专利名称(译)	通过S-1确定癌症化学疗法的给药效果的方法

公开(公告)号	JP6175711B2	公开(公告)日	2017-08-09
申请号	JP2013071040	申请日	2013-03-29

[标]申请(专利权)人(译)	高信化学株式会社
申请(专利权)人(译)	国立大学法人千叶 高信化学株式会社
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人千叶
[标]发明人	丹沢秀樹 笠松厚志 鵜澤一弘
发明人	丹沢 秀樹 笠松 厚志 鵜澤 一弘
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/48 C12Q1/68 C12N15/09
FI分类号	G01N33/68.ZNA G01N33/50.P G01N33/53.V G01N33/48.P G01N33/53.Y C12Q1/68.A C12N15/00.A C12N15/09.Z C12Q1/6813.Z C12Q1/686.Z
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/BB27 2G045/DA14 2G045/DA44 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/GA13 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR35 4B063/QR77 4B063/QS25
代理人(译)	庄司隆 Shinobe百合子
优先权	2012100681 2012-04-26 JP
其他公开文献	JP2013242298A5 JP2013242298A
外部链接	Espacenet

摘要(译)

本发明要解决的问题本发明的一个目的是提供一种快速，方便和容易地用癌症化学疗法治疗其治疗效果的方法，其中用抗癌药物（下文缩写为S-1）混合三组分替加氟，吉美嘧啶和奥替拉西钾作为活性成分，以及一种准确确定的方法。 解决方案：在测量来自诊断对象的活体样品中核心蛋白聚糖基因表达的步骤a中，基于作为测量结果获得的基因的表达水平判断S-1的给药效果的步骤b，和S-1化疗，包括： 【选择图】无



(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		
G01N 33/68	(2006.01)	G01N	33/68	ZNA
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	P
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	V
G01N 33/48	(2006.01)	G01N	33/48	P
C12Q 1/68	(2006.01)	G01N	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)
(22)出願日 平成25年3月29日(2013.3.29)
(65)公開番号 特開2013-242298(P2013-242298A)
(43)公開日 平成25年12月5日(2013.12.5)
審査請求日 平成28年3月23日(2016.3.23)
(31)優先権主張番号 特願2012-100681(P2012-100681)
(32)優先日 平成24年4月26日(2012.4.26)
(33)優先権主張国 日本国(JP)

(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、独創的シーズ展開事業「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

(73)特許権者 304021831
国立大学法人 千葉大学
千葉県千葉市稲毛区弥生町１番３３号
(74)代理人 100088904
弁理士 庄司 隆
(74)代理人 100124453
弁理士 資延 由利子
(74)代理人 100135208
弁理士 大杉 卓也
(74)代理人 100152319
弁理士 曽我 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