

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-526680

(P2014-526680A)

(43) 公表日 平成26年10月6日(2014.10.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/574 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/574 B	2 GO 4 5
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 V	
<b>GO 1 N 33/48 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/48 Z N A P	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 70 頁)

(21) 出願番号 特願2014-529027 (P2014-529027)  
 (86) (22) 出願日 平成24年9月12日 (2012. 9. 12)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年5月8日 (2014. 5. 8)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/067758  
 (87) 国際公開番号 W02013/037789  
 (87) 国際公開日 平成25年3月21日 (2013. 3. 21)  
 (31) 優先権主張番号 11180878.8  
 (32) 優先日 平成23年9月12日 (2011. 9. 12)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 513008731  
 ユニヴェルシテイ ト ヘント  
 UNIVERSITEIT GENT  
 ベルギー、ビー-9000 ヘント、シン  
 トーピーテルスニューストラート 25  
 Sint-Pietersnieuwst  
 raat 25, B-9000 Gent,  
 Belgium  
 (74) 代理人 100065248  
 弁理士 野河 信太郎  
 (74) 代理人 100159385  
 弁理士 甲斐 伸二  
 (74) 代理人 100163407  
 弁理士 金子 裕輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結腸直腸ガンのニューレグリン-1に基づく予後予測及び治療層別化

(57) 【要約】

本発明は、結腸直腸ガンの予後予測、治療層別化及び治療に関する。より具体的には、本発明は、患者のサンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞における膜貫通1型ニューレグリン-1レベルの顕著な上昇により、該患者が腫瘍関連間葉細胞における膜貫通1型ニューレグリン-1レベルが低い患者と比較して、より不良な予後を有することが示されることを開示する。更に、本発明は、腫瘍関連間葉細胞における膜貫通1型ニューレグリン-1発現を利用して、結腸直腸ガン治療の間のHER1インヒビターに対する抵抗性を予測し、及び/又は患者がニューレグリン-1及び/又はHER3の活性阻止に基づく治療の利益を享受するかどうかを予測することに関する。

【選択図】 図 1 A

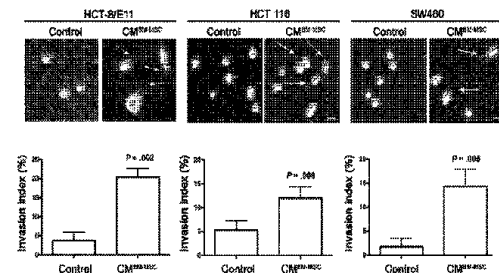


Figure 1 A

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

- 検査対象者から採取した生物学的サンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞における膜貫通 1 型ニューレグリン-1 のレベルを測定すること、及び

- 該膜貫通 1 型ニューレグリン-1 レベルを、対象者の健常組織サンプルから得た膜貫通 1 型ニューレグリン-1 の参照レベルと比較すること

を含んでなり、検査対象者のサンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞における膜貫通 1 型ニューレグリン-1 レベルが健常組織のレベルと比較して顕著に上昇していることが、検査対象者がより不良な予後を有することを示す、検査対象者における結腸直腸ガンのインビトロ予後予測法。

10

## 【請求項 2】

- 前記予後予測が、結腸直腸ガンを有する患者がニューレグリン-1 活性の阻止若しくは HER3 のチロシンキナーゼ活性の阻止に基づく治療の利益を享受するかどうかの判定を包含し、患者のサンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞における膜貫通 1 型ニューレグリン-1 レベルが健常組織のレベルと比較して顕著に上昇していることが、該患者がニューレグリン-1 活性の阻止若しくは HER3 のチロシンキナーゼ活性の阻止に基づく治療の利益を享受することを示すか、又は

- 前記予後予測が、結腸直腸ガンを有する患者が HER1 活性の阻止に基づく治療に対する抵抗性を有するか若しくは発症したかの判定若しくは決定を包含し、患者のサンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞における膜貫通 1 型ニューレグリン-1 レベルが健常組織のレ

20

## 【請求項 3】

前記生物学的サンプルが前記検査対象者から採取した結腸直腸ガン組織である、請求項 1 又は 2 に記載のインビトロ法。

## 【請求項 4】

前記膜貫通 1 型ニューレグリン-1 が凍結サンプルについての免疫組織化学により測定される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のインビトロ法。

## 【請求項 5】

前記サンプル内の腫瘍関連間葉細胞の 25% 以上が膜貫通 1 型ニューレグリン-1 染色を含むとき、膜貫通 1 型ニューレグリン-1 レベルは顕著に上昇しているとする、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のインビトロ法。

30

## 【請求項 6】

前記より不良な予後が、国際対ガン連合に従うガンステージでより高いステージに属する見込みが顕著に上昇していること、及び/又は腫瘍浸潤深度が増大する見込みが顕著に上昇していること、及び/又は無増悪生存率が減少する見込みが顕著に上昇していることに対応する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のインビトロ法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

40

## 発明の技術分野

本発明は結腸直腸ガンの予後予測及び/又は治療層別化に関する。より具体的には、本発明は、患者のサンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞における膜貫通 1 型ニューレグリン-1 レベルの顕著な上昇が、腫瘍関連間葉細胞における膜貫通 1 型ニューレグリン-1 レベルが低い患者と比較して、より不良な予後と関連することを開示する。更に、本発明は、腫瘍関連間葉幹細胞における膜貫通 1 型ニューレグリン-1 発現を利用して、結腸直腸ガン治療の間の HER1 インヒビターに対する抵抗性を予測し、そして/又は患者がニューレグリン-1 及び/又は HER3 の活性阻止に基づく治療の利益を享受するかどうかを予測することに関する。

## 【背景技術】

50

## 【0002】

## 背景技術

結腸直腸ガン(CRC)は、米国において、男性及び女性の両方において3番目に多いガンであり、全ての新たなガン症例及びガンによる死亡例の9%を占める(1)。診断に際して、CRC症例の19%が転移性であり、CRC患者の5年全生存率は65%である一方で、転移性疾患では僅か12%である(1)。腫瘍悪化には、ガン細胞と腫瘍関連間葉細胞との間の複雑なヘテロ型の多細胞相互作用が関与することを証明する証拠が出て来ている(2)。CRCは、増殖中の腫瘍における骨髄由来間葉幹細胞(BM-MSc)の遠位動員が関与する、巧妙に仕組みられた癒着性反応が付随することが多い。BM-MScは、骨芽細胞、軟骨細胞及び脂肪細胞などの複数の細胞系統に分化する能力を有する(3)。マウスモデルにより、BM-MScは、結腸腫瘍異種移植片に移動し(4, 5)、腫瘍関連間葉細胞の前駆体であり(6-8)、この腫瘍関連間葉細胞がその後ガン悪化を刺激する(9, 10)ことが明らかにされた。腫瘍に対するMScの向性は、創傷治癒及び組織修復の間の創傷への移動を反復すると考えられる(11, 12)。

10

## 【0003】

ヒト上皮成長因子(HER/ErbB)レセプターチロシンキナーゼ(RTK)及びそのリガンドは、ガン細胞増殖、生存、運動性、浸潤及び転移に関与する。哺乳動物においては次の4つのHERレセプターが説明されている: HER1(ErbB1又は上皮成長因子レセプター[EGFR])、HER2[ErbB2又はneu]、HER3[ErbB3]及びHER4[ErbB4]。これらレセプターの活性化は、次の3つの異なる機序により起こり得る: 特異的HERリガンドとの相互作用、該レセプターの過剰発現、及び点変異又は短縮化などの分子変化。HERレセプターがシグナル伝達機能を遂行するのは二量体化及びトランスリン酸化を通じてである。全CRCの約80%が、転移増加及び患者生存率低下と相関するHER1発現又は過剰発現を示す(13, 14)。HER3発現がCRC悪化に関与すること、及びそのリン酸化は予後予測上の価値を有することが示されている(15-17)。

20

## 【0004】

ニューレグリン(NRG)ファミリーの増殖因子は、オルターナティブスプライシングオフを介して4つの別個の遺伝子(NRG-1、NRG-2、NRG-3及びNRG-4)を生じる多くのヘパリン結合性糖タンパク質を含んでなる。NRG-1及びNRG-2は最も近縁である: 共にHER3と相互作用する。NRG-1はHER3に高い結合親和性を有し、優先的には、HER2-依存性のPI3K動員を通じて作用する(18-20)。オルターナティブスプライシング及び複数のプロモーターによる調節は、少なくとも15の異なるNRG-1イソフォームを生じる; ほとんどが膜貫通前駆体として合成され、腫瘍壊死因子-変換酵素(TACE)などの細胞表面プロテアーゼの作用により可溶性因子として遊離される(21, 22)。NRGは、黒色腫、乳及び卵巣腫瘍において上皮細胞により産生される(23, 24)が、胃及び乳腫瘍においては腫瘍関連間葉細胞によっても産生される(25-27)。US 2007/0275404及びEschrichら(28)は、NRG-2遺伝子の発現がそれぞれ、乳ガン及び結腸直腸ガンの予後マーカーとして使用し得ることを開示する。

30

## 【0005】

更に、Yoshiokaら(29)は、NRG-1(ヒレグリン)が、HER2/HER3シグナル伝達を介して、ヒト結腸ガン細胞株の高度に肝臓転移性の表現型に関与し得ることを開示する。Lilesら(30)は、線維芽細胞由来NRG-1が、HER3のリン酸化を介して膵臓ガン細胞株の増殖を促進すること、及びHER1(EGFR)-HER3(erbB3)の組合せ阻害により、該増殖を最良に妨害できることを開示する。Venkateswarluら(Oncogene 2002: 78-86)は、オートクラインであるヒレグリンが結腸ガン細胞の細胞サイクル再進入を担っていること、及びヒレグリン中和抗体での処理が結腸ガン細胞のアポトーシスを生じることを開示する。更に、Tatsuguchiら(Gastroenterology 2011, vol 140 N° 5 suppl 1: S340)は、正常組織の対応物と比較して顕著により高いヒレグリン発現レベルがCRC組織サンプルで(すなわち、ガン細胞の細胞質で優勢に)見出されることを開示し、ヒレグリンがCRC患者の予後予測に有意義な有用マーカーであり得ると結論付けている。Yonezawaら(Gastroenterology 2004, vol 126 N° 4 suppl 2: A263)は、ヒレグリンの過剰発現がガン細胞及び間葉細胞で免疫組織化学的に観察されたこと、及びヒレグリンがオートクライン及びパラクリン機構を通じてVEGF分泌を調

40

50

節し得ることを開示する。しかし、間葉細胞のみにおける膜貫通ヒレグリンの高発現とより不良な予後との間の相関は記載も示唆もされていない。

【0006】

約19%のCRC患者は初期には転移性疾患を呈し、これら患者の標準化学療法レジメンは、しばしばモノクローナル抗体たるセツキシマブ又はパニツムマブと組み合わせた化学療法剤5-フルオロウラシル、イリノテカン及びオキサリプラチンである(31, 32)(NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Colon Cancer. Version 3.2011)。セツキシマブ及びパニツムマブはガン細胞のHER1(EGFR)に結合することにより、下流の細胞内シグナル伝達経路を遮断する。このカスケードの1つのメンバーはKRASであり、最近数年にわたり、KRAS変異を有する患者が標準化学療法へのセツキシマブ又はパニツムマブの追加の利益を享受しないことを示唆する証拠が増えている(33)。KRAS変異は全CRC標本の約40~60%に見出される。結果として、KRAS検査は、転移性CRCを有する患者について、セツキシマブ又はパニツムマブの投与前に必須である(33)。

10

【0007】

ペルツズマブは、HER2に特異的に結合する組換えヒト化mAbであり(34)、HER2ホモ二量体化及びHER2/HER3ヘテロ二量体化を防止する(35)。この作用機序のため、ペルツズマブの抗腫瘍活性は、HER2が過剰発現する腫瘍に限定されず、したがって治療用モノクローナル抗体たるトラスツズマブ(これは、HER2細胞外ドメインの非オーバーラップ膜近傍領域に結合し、HER2/HER3ヘテロ二量体化を阻害できない)とは異なる。加えて、局所的に進行したCRC又は転移性CRCを有する患者であってセツキシマブに应答しなかった患者においてセツキシマブと組み合わせたペルツズマブの有効性を調べる第I/II相臨床試験が、現在、カナダ及び米国で進行中である(36)。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、ヒト結腸直腸ガン患者のサンプル中の腫瘍関連間葉細胞における膜貫通1型ニューレグリン-1のレベル上昇が、驚くべきことに及び顕著に、腫瘍ステージ、浸潤深度及び5年無増悪生存率に関して、該患者のより不良な予後予測と相関することを開示する。更に、この予後予測は、これら患者がニューレグリン-1及び/又はHER3活性の阻止に基づく治療の利益を享受することを示す。よって、この予後予測は、患者が(例えば、ペルツズマブとセツキシマブとの)組合せ治療の利益を享受するかどうか及び/又は患者がHER1インヒビター(例えばセツキシマブ)に対する抵抗性を有するかどうかを予測することにより、結腸直腸ガンの治療を微調整するために有益である。

30

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1A】培養CRC細胞の形態及びマトリクス浸潤に対するBM-MScの効果。

【図1B】培養CRC細胞の形態及びマトリクス浸潤に対するBM-MScの効果。

【図1C】培養CRC細胞の形態及びマトリクス浸潤に対するBM-MScの効果。

【図1D】培養CRC細胞の形態及びマトリクス浸潤に対するBM-MScの効果。

【図1E】培養CRC細胞の形態及びマトリクス浸潤に対するBM-MScの効果。

40

【図2A】CRC細胞の生存及び腫瘍形成に対するBM-MSc又はCM<sup>BM-MSc</sup>の効果。

【図2B】CRC細胞の生存及び腫瘍形成に対するBM-MSc又はCM<sup>BM-MSc</sup>の効果。

【図2C】CRC細胞の生存及び腫瘍形成に対するBM-MSc又はCM<sup>BM-MSc</sup>の効果。

【図2D】CRC細胞の生存及び腫瘍形成に対するBM-MSc又はCM<sup>BM-MSc</sup>の効果。

【図2E】CRC細胞の生存及び腫瘍形成に対するBM-MSc又はCM<sup>BM-MSc</sup>の効果。

【図2F】CRC細胞の生存及び腫瘍形成に対するBM-MSc又はCM<sup>BM-MSc</sup>の効果。

【図2G】CRC細胞の生存及び腫瘍形成に対するBM-MSc又はCM<sup>BM-MSc</sup>の効果。

【図3A】CRC細胞におけるHER活性化に対するCM<sup>BM-MSc</sup>の効果。

【図3B】CRC細胞におけるHER活性化に対するCM<sup>BM-MSc</sup>の効果。

【図3C】CRC細胞におけるHER活性化に対するCM<sup>BM-MSc</sup>の効果。

50

- 【図 3 D】CRC細胞におけるHER活性化に対するCM<sup>BM-MSC</sup>の効果。
- 【図 3 E】CRC細胞におけるHER活性化に対するCM<sup>BM-MSC</sup>の効果。
- 【図 3 F】CRC細胞におけるHER活性化に対するCM<sup>BM-MSC</sup>の効果。
- 【図 4 A】BM-MSCによるtNRG-1の発現及び可溶性NRG-1の遊離。
- 【図 4 B】BM-MSCによるtNRG-1の発現及び可溶性NRG-1の遊離。
- 【図 4 C】BM-MSCによるtNRG-1の発現及び可溶性NRG-1の遊離。
- 【図 4 D】BM-MSCによるtNRG-1の発現及び可溶性NRG-1の遊離。
- 【図 4 E】BM-MSCによるtNRG-1の発現及び可溶性NRG-1の遊離。
- 【図 5 A】BM-MSCによる機能的に活性なNRG-1の遊離。
- 【図 5 B】BM-MSCによる機能的に活性なNRG-1の遊離。 10
- 【図 5 C】BM-MSCによる機能的に活性なNRG-1の遊離。
- 【図 5 D】BM-MSCによる機能的に活性なNRG-1の遊離。
- 【図 5 E】BM-MSCによる機能的に活性なNRG-1の遊離。
- 【図 5 F】BM-MSCによる機能的に活性なNRG-1の遊離。
- 【図 6 A】CRC細胞におけるパラクリンCM<sup>BM-MSC</sup>及びNRG-1-媒介HER3/PI-3K/AKT活性化の機能的示唆。
- 【図 6 B】CRC細胞におけるパラクリンCM<sup>BM-MSC</sup>及びNRG-1-媒介HER3/PI-3K/AKT活性化の機能的示唆。
- 【図 6 C】CRC細胞におけるパラクリンCM<sup>BM-MSC</sup>及びNRG-1-媒介HER3/PI-3K/AKT活性化の機能的示唆。 20
- 【図 6 D】CRC細胞におけるパラクリンCM<sup>BM-MSC</sup>及びNRG-1-媒介HER3/PI-3K/AKT活性化の機能的示唆。
- 【図 6 E】CRC細胞におけるパラクリンCM<sup>BM-MSC</sup>及びNRG-1-媒介HER3/PI-3K/AKT活性化の機能的示唆。
- 【図 7 A】インビボでの細胞数及び腫瘍進展に対するペルツズマブの効果。
- 【図 7 B】インビボでの細胞数及び腫瘍進展に対するペルツズマブの効果。
- 【図 7 C】インビボでの細胞数及び腫瘍進展に対するペルツズマブの効果。
- 【図 7 D】インビボでの細胞数及び腫瘍進展に対するペルツズマブの効果。
- 【図 8 A】初代ヒトCRCにおけるtNRG-1の発現。
- 【図 8 B】初代ヒトCRCにおけるtNRG-1の発現。 30
- 【図 8 C】初代ヒトCRCにおけるtNRG-1の発現。
- 【図 8 D】初代ヒトCRCにおけるtNRG-1の発現。
- 【図 8 E】初代ヒトCRCにおけるtNRG-1の発現。
- 【図 8 F】初代ヒトCRCにおけるtNRG-1の発現。
- 【図 8 G】初代ヒトCRCにおけるtNRG-1の発現。
- 【図 9 A】BM-MSC及びT-MCの特徴決定。
- 【図 9 B - 1】BM-MSC及びT-MCの特徴決定。
- 【図 9 B - 2】BM-MSC及びT-MCの特徴決定。
- 【図 9 B - 3】BM-MSC及びT-MCの特徴決定。
- 【図 9 C】BM-MSC及びT-MCの特徴決定。 40
- 【図 10 A】CRC細胞株の細胞サイクル進行に対するBM-MSCの効果。
- 【図 10 B】CRC細胞株の細胞サイクル進行に対するBM-MSCの効果。
- 【図 11】免疫欠損マウスでヒトCRC細胞により樹立した腫瘍異種移植片におけるマウス及びヒトの間葉細胞の存在。
- 【図 12】tNRG-1抗体の特異性。
- 【図 13】tNRG-1を発現する間葉細胞は -SMA陽性である。
- 【図 14】CM<sup>HCT-8/E11</sup>は、Matrigelメンブレンを通過するBM-MSCの浸潤を刺激する。
- 【発明を実施するための形態】
- 【0010】

図1. 培養CRC細胞の形態及びマトリクス浸潤に対するBM-MSCの効果。(A)  $CM^{BM-MSC}$ で24時間処理した後のコラーゲンI型上での単一HCT-8/E11、HCT 116及びSW480 CRC細胞の形態を示す位相差画像。矢印は浸潤伸長を示す。スケールバー、20  $\mu m$ (上パネル)。合計10視野について、各視野で計数した細胞総数に対する浸潤伸長を有する細胞数の比である浸潤指数の算出によるコラーゲン浸潤の定量。結果は、3つの独立実験の平均及び標準誤差として表す。P値はカイ二乗検定を用いて算出した；統計学的に有意なP値を示す(下パネル)。(B)  $CM^{BM-MSC}$ で24時間処理した後のコラーゲンI型上での代表的なファロイジン-Alexa Fluor 594染色HCT-8/E11細胞のレーザ走査共焦点画像。スケールバー、20  $\mu m$ (上パネル)。各条件について25のHCT-8/E11細胞の形状係数を用いた形態定量化を示す箱ひげ図。箱ひげ図にメジアン、四分位数並びに最高値及び最低値を示す。形状係数は(周長)<sup>2</sup>/(4面積)として算出した。P値はマンホイットニー検定を用いて算出した；統計学的に有意なP値を示す(下パネル)。(C)コントロール条件下及びBM-MSC共培養条件下で種々の期間後の代表的なHCT-8/E11-GFPスフェロイドの明視野画像及びGFP-蛍光画像の組合せ。スケールバー、300  $\mu m$ 。(D及びE)コントロール条件下及びBM-MSC共培養条件下で種々の期間後のHCT-8/E11-GFPスフェロイドの形状係数(周長<sup>2</sup>/4面積)(D、左パネル)及び面積(E、左パネル)のImage J-支援算出。結果は、3つの独立実験からの6スフェロイドの平均及び標準誤差として表す。P値は、反復測定二元配置ANOVA検定を用いて算出した；統計学的に有意なP値を示す。コントロール条件下又はBM-MSC共培養条件下で96時間培養したファロイジン-Alexa Fluor 594染色HCT-8/E11-GFPスフェロイドの典型的な浸潤フロントの共焦点画像。スケールバー、50  $\mu m$ ；挿入図はスフェロイド全体を示す、スケールバー、300  $\mu m$ (D、右パネル)。コントロール条件下又はBM-MSC共培養条件下で96時間培養したHCT-8/E11-GFPスフェロイドのパラフィン包埋切片を、増殖マーカーKi67について免疫染色した。条件あたり3スフェロイドの12画像から算出した増殖細胞の平均数及び標準誤差を示す。スケールバー、100  $\mu m$ ；挿入図スケールバー、50  $\mu m$ (E、右パネル)。

10

20

30

40

50

#### 【0011】

図2. CRC細胞の生存及び腫瘍形成に対するBM-MSC又は $CM^{BM-MSC}$ の効果。(A)無血清条件下で種々の期間、 $CM^{BM-MSC}$ で処理した生存CRC細胞の総数の定量。結果は、3つの独立実験の平均及び標準誤差として表す。P値は、反復測定二元配置ANOVA検定を用いて算出した；統計学的に有意なP値を示す(左パネル)。無血清条件下で6日間、 $CM^{BM-MSC}$ で処理したCRC細胞の位相差画像。スケールバー、100  $\mu m$ (右パネル)。(B) $CM^{BM-MSC}$ で15分間処理したHCT-8/E11におけるAKT(S473)及びBAD(S136)リン酸化並びにAKT及びBAD発現レベルのウェスタンブロット評価(左パネル)； $CM^{BM-MSC}$ で6時間処理したHCT-8/E11におけるBAX及びBCL-2発現レベルのウェスタンブロット評価(中央パネル)； $CM^{BM-MSC}$ で6時間処理したHCT 116における全長PARP(113kDa)及び切断PARP(89kDa)のウェスタンブロット評価(右パネル)。中央パネルについて、ローディングコントロールとしてチューブリンを使用した。(C)ヌードマウスに、 $10^6$ のCRC細胞(HCT-8/E11又はSW480又はHCT 116)を単独で若しくは $2 \cdot 10^6$ のBM-MSC若しくは $CM^{BM-MSC}$ と共に、又は $2 \cdot 10^6$ のBM-MSC単独をs.c.注射した。各条件についての接種動物数、腫瘍を示した動物数及び腫瘍獲得率。(D)及び(E)外径測定による腫瘍容積の週次評価。マウスは不定時点(すなわち、腫瘍容積の形成( $\pm 1 \text{ cm}^3$ )を制限する倫理的末期)で安楽死させた。(F)腫瘍重量は外科的切除後に評価した。(D)、(E)及び(F)では、結果は、3つの独立実験からの10の異種移植片の平均及び標準誤差として表す。腫瘍容積については、P値は反復測定二元配置ANOVA検定を用いて算出した。腫瘍重量については、P値はマンホイットニー検定を用いて算出した；統計学的に有意なP値を示す。(G)接種から2週間以内の選択した異種移植片を、Ki67増殖マーカーを用いるIHC(上パネル)又はアポトーシスを起こした核を有する細胞(赤矢印)を緑色で検出するTUNELアッセイ(下パネル)に供した。HCT-8/E11対HCT-8/E11+BM-MSCの代表的異種移植片画像を示す。データは、2つの原発腫瘍の12画像から算出した平均及び標準誤差として表す。スケールバー、100  $\mu m$ ；挿入図スケールバー、50  $\mu m$ 。

#### 【0012】

図3. CRC細胞におけるHER活性化に対する $CM^{BM-MSC}$ の効果。(A) $CM^{BM-MSC}$ で処理したHC

T-8/E11細胞の溶解物を、42のRTKの相対的チロシンリン酸化レベルについて分析した。各RTKを2連でスポットする。リン酸化HER1、HER2、HER3及びHER4(p-HER1~4)を示す。(B)示した溶解物を、HER3に対するウサギポリクローナル抗体又はウサギ免疫グロブリン(IgG)で免疫沈降(IP)させた。免疫沈降複合体をSDS-PAGEにより分解し、抗p-Tyr又は抗HER3抗体でイムノプロットした。(C)CM<sup>BM-MSC</sup>で処理したHCT-8/E11、HCT 116及びSW480細胞におけるY 1289 p-HER3及び総HER3の発現レベルのウェスタンブロット評価。(D)CM<sup>BM-MSC</sup>で処理したHCT/8E11におけるY1068 p-HER1、Y1196 p-HER2、Y1248 p-HER2、HER1及びHER2の発現レベルのウェスタンブロット評価。(E)CM<sup>BM-MSC</sup>で処理したHCT-8/E11におけるsiHER1、siHER2及びsiHER3トランスフェクション後のY1289 p-HER3、S473 p-AKT、S136 p-BAD、総HER1、総HER2、総HER3、総AKT及び総BAD発現レベルのウェスタンブロット評価。ローディングコントロールとしてチューブリンを使用した。(F)CM<sup>BM-MSC</sup>で処理したHCT-8/E11におけるY1289 p-HER3及びS473 p-AKTに対する薬剤又は抗体処理の効果。セツキシマブは3 µM、ラパチニブは1 µM、トラスツズマブ及びペルツズマブは25 µg/mlで使用した。(A)~(F)において、細胞はCM<sup>BM-MSC</sup>で15分間処理した。

10

## 【0013】

図4 . BM-MSCによるtNRG-1の発現及び可溶性NRG-1の遊離。(A)特有のドメインを有するtNRG-1及び可溶性NRG-1の概略図。tNRG-1は、型特異的なN末端領域(N-term)、ヘパリン結合性Ig様ドメイン(III型及びVI型には存在せず)、推定のグリコシル化部位を有するスペーサー領域(sp)、EGFc及び可変EGFドメイン( / )からなるEGF様ドメイン、可変ストーク(1/2/4)、膜貫通ドメイン(TM)、共通細胞質テイル(c)及び可変長の細胞質テイル(a/b)の存在によって特徴付けることができる。ストーク領域でのタンパク質分解性切断( 缺で示す)は、可溶性の活性NRG-1を生じる。(B)tNRG-1発現は、BLM、HCT-8/E11及びBM-MSCの全細胞溶解物(左パネル)又はビオチン化BM-MSCのストレプトアビジン若しくはコントロールタンパク質G-セファロースビーズ沈降後(右パネル)のウェスタンブロットニングにより分析した。(C)BLM、HCT-8/E11及びBM-MSCにおけるqRT-PCRによるNRG-1の相対mRNA量。(D)CM<sup>BM-MSC</sup>中のヘパリン結合性因子をヘパリン沈降により精製した。SDS-PAGEを精製ヘパリン結合性タンパク質について行った。40~50kDa領域のタンパク質をトリプシン処理し、LC-MS/MS分析によりペプチドを同定した。NRG-1のEGFcドメイン及びIg様ドメインの4つの独特なペプチドを同定した。(E)ヘパリン沈降で精製したCM<sup>BM-MSC</sup>のヘパリン結合性画分におけるNRG- 1及びNRG- 1の存在を証明するウェスタンブロット分析。

20

30

## 【0014】

図5 . BM-MSCによる機能的に活性なNRG-1の遊離。(A)HCT-8/E11をCM<sup>BM-MSC</sup>又は漸増濃度のrNRG- 1で15分間処理して誘導されるY1289 p-HER3のウェスタンブロット評価(上パネル)及び定量(下パネル)。矢印は、外挿により、CM<sup>BM-MSC</sup>のリン酸化能力が±10ng/mlのrNRG- 1のリン酸化能力と同等であることを示す。(B)rNRG- 1(10ng/ml)で15分間処理したHCT-8/E11におけるY1068 p-HER1、Y1196 p-HER2、Y1248 p-HER2、総HER1及び総HER2の発現レベルのウェスタンブロット評価。(C)示した濃度のrNRG- 1で24時間処理したHCT-8/E11、HCT116及びSW480 CRC細胞のコラーゲン浸潤の定量。浸潤指数は、少なくとも3つの独立実験の平均及び標準誤差である。P値はカイ二乗検定を用いて算出した；統計学的に有意なP値を示す。(D)無血清条件下に漸増濃度のrNRG- 1で処理したHCT-8/E11細胞の種々の期間での生存細胞総数の定量。結果は、3つの独立実験の平均及び標準誤差である。P値は、反復測定二元配置ANOVA検定を用いて算出した；統計学的に有意なP値を示す(左パネル)。無血清条件下にrNRG- 1(10ng/ml)で6日間処理したHCT-8/E11細胞の位相差画像。スケールバー、100 µm(右パネル)。(E)CM<sup>BM-MSC</sup>で15分間処理したHCT-8/E11におけるS473 p-AKT、S136 p-BAD、総AKT及び総BADの発現レベルのウェスタンブロット評価(左パネル)；rNRG- 1(10ng/ml)で6時間処理したHCT-8/E11におけるBAX及びBCL-2の発現レベルのウェスタンブロット評価(右上パネル)；rNRG- 1(10ng/ml)で6時間処理したHCT 116における全長PARP(113kDa)及び切断PARP(89kDa)の発現レベルのウェスタンブロット評価(右下パネル)。右上パネルについては、チューブリンをローディングコントロールとして使用した。(F)抗NRG- 1/ 1中和抗体(2.5 µg/ml)若しくはその両方の組合せ又は

40

50

コントロールIgGアイソタイプを補充したCM<sup>BM-MSC</sup>で15分間処理したHCT-8/E11におけるY1289 p-HER3及び総HER3の発現レベルのウェスタンブロット評価。

【 0 0 1 5 】

図6 . CRC細胞におけるパラクリンCM<sup>BM-MSC</sup>及びNRG-1-媒介HER3/PI-3K/AKT活性化の機能的示唆。(A)抗NRG-1/1中和抗体(各2.5 µg/ml)の組合せ又はコントロールIgGアイソタイプを補充したCM<sup>BM-MSC</sup>で24時間処理したHCT-8/E11細胞のコラーゲン浸潤の定量。(B)siHER1、siHER2及びsiHER3トランスフェクション後にCM<sup>BM-MSC</sup>で24時間処理したHCT-8/E11細胞のコラーゲン浸潤の定量。(C)CM<sup>BM-MSC</sup>誘導形態変化及びコラーゲン浸潤に対する薬剤又は抗体処理の効果。セツキシマブは3 µM、ラパチニブは1 µM、トラスツズマブ及びペルツズマブは25 µg/mlで使用した。上パネルは、コラーゲンI型マトリクス上でのHCT-8/E11細胞の位相差画像及びコラーゲン浸潤の定量を示す。矢印は浸潤伸長を示す。スケールバー、50 µm。下パネルは、コラーゲンI型マトリクス上でのHCT-8/E11細胞のF-アクチン画像及び形状係数を用いる形態の定量を示す箱ひげ図を示す。スケールバー、20 µm。メジアン、四分位数並びに最高値及び最低値を箱ひげ図に示す。形状係数は(周長)<sup>2</sup>/(4 面積)として算出した。P値はカイ二乗検定(浸潤指数)及びマンホイットニー検定(形状係数)を用いて算出した；統計学的に有意なP値を示す。(D)示した濃度のPI3KインヒビターLY294002、ワートマニン、AKTインヒビターGSK2141795と組み合わせてCM<sup>BM-MSC</sup>で24時間処理したHCT-8/E11細胞のコラーゲン浸潤の定量。(E)siAKTトランスフェクション後にCM<sup>BM-MSC</sup>で24時間処理したHCT-8/E11細胞のコラーゲン浸潤の定量。挿入パネルは、siAKTトランスフェクション後のAKT発現レベルのウェスタンブロット評価を示す。チューブリンをローディングコントロールとして使用した。(A)~(E)において、浸潤指数は、少なくとも3つの独立実験の平均及び標準誤差である。P値はカイ二乗検定を用いて算出した；統計学的に有意なP値を示す。

10

20

【 0 0 1 6 】

図7 . インビボでの細胞数及び腫瘍進展に対するペルツズマブの効果。(A)CM<sup>BM-MSC</sup>-誘導生存HCT-8/E11細胞総数に対するペルツズマブ(25 µg/ml)及びビヒクル単独の効果。(B)及び(C)2.10<sup>6</sup>のBM-MSCを伴うか又は伴わない10<sup>6</sup>のHCT-8/E11細胞に由来する皮下異種移植片の腫瘍容積(B)及び腫瘍重量(C)。1週間後、マウスにビヒクル単独又はペルツズマブ(600 µg/マウス)を週3回、腹腔内注射した。腫瘍容積は外径測定により毎週評価した。マウスは、不定時点(すなわち、腫瘍容積の形成(±1 cm<sup>3</sup>)を制限する倫理的末期)で安楽死させた。腫瘍重量は外科的切除後に評価した。(A)、(B)及び(C)では、結果は、2つの独立実験からの10の異種移植片の平均及び標準誤差として表す。(A)及び(B)では、P値は、反復測定二元配置ANOVA検定を用いて算出した。(C)では、P値は、マンホイットニー検定を用いて算出した；統計学的に有意なP値を示す。(D)数週間以内のビヒクル単独又はペルツズマブ処置のHCT-8/E11+BM-MSCに由来する切除異種移植片におけるKi67標識。2つの原発腫瘍の12画像から算出したKi67陽性細胞の平均数及び標準誤差を示す。スケールバー、100 µm；挿入図のスケールバー、50 µm。

30

【 0 0 1 7 】

図8 . 初代ヒトCRCにおけるtNRG-1の発現。(A)低発現及び高発現のIHCスコア(上パネル)並びに正常肝臓及び肝臓転移サンプル(下パネル)を説明する代表的なtNRG-1染色初代ヒトCRCサンプル。(B)正常及びCRC組織におけるtNRG-1発現レベル、並びにtNRG-1 IHCスコアと浸潤深度、UICCステージ及び5年PFSとの関連。正常組織対腫瘍組織のtNRG-1発現の比較並びにtNRG-1と5年PFSとの関連は、カイ二乗検定を用いて行った。tNRG-1と臨床病理学的パラメータとの関連は、傾向についてのカイ二乗検定により分析した。(C)腫瘍組織(T)又は近傍正常組織(N)からの初代間葉細胞の3つの適合ペアにおけるtNRG-1前駆体発現のウェスタンブロット分析。(D)及び(E)患者1から得た腫瘍組織(T)及び近傍正常組織(N)からの初代間葉細胞のCM(D)又は同一患者のCRC組織(T)及び近傍正常結腸直腸組織(N)からの間質液(E)で処理したHCT-8/E11におけるY1289 p-HER3、S473 p-AKT、総HER3及び総AKTの発現レベルのウェスタンブロット評価。(F)ペルツズマブ(25 µg/ml)を補充したCM<sup>T-MC</sup>で24時間処理したHCT-8/E11細胞のコラーゲン浸潤の定量。浸潤指数は

40

50

、少なくとも3つの独立実験の平均及び標準誤差である。P値は、カイ二乗検定を用いて算出した；統計学的に有意なP値を示す。(G)無血清条件下に $CM^{T-MC}$ で処理したCRC細胞の種々の期間での生存総数の定量。ペルツズマブは $25 \mu\text{g/ml}$ で使用した。結果は、3つの独立実験からの平均及び標準誤差として示す。P値は反復測定二元配置ANOVA検定を用いて算出した；統計学的に有意なP値を示す。

#### 【0018】

図9．BM-MSC及びT-MCの特徴決定。(A)BM-MSC及びT-MCは、プラスチック接着性の紡錘状線維芽細胞様細胞の均質集団を示す。スケールバー、 $200 \mu\text{m}$ 。(B)BM-MSC及びT-MCにおける表面抗原の発現。BM-MSC及びT-MCは、CD73、CD90及びCD105について陽性であり、CD34、CD45、CD19、CD11b及びHLA-DRについて陰性であった。(C)BM-MSC及びT-MCを、脂肪細胞分化マーカー(左パネル)及び骨細胞分化マーカー(右パネル)についてインビトロで調べた。細胞を分化培地又はコントロール培地中で3週間培養した。脂質小滴の蓄積(脂肪細胞分化を示す)は、オイルレッドOでの染色により証明した。骨細胞分化は、アリザリンレッド染色により証明されるように、カルシウム沈着により示した。顕著な脂肪細胞化及び骨細胞分化がBM-MSCで誘導された一方、T-MCで誘導された脂肪細胞化及び骨細胞分化は限定的に過ぎなかった。スケールバー、 $100 \mu\text{m}$ (左パネル)； $200 \mu\text{m}$ (右パネル)。

10

図10．CRC細胞株の細胞サイクル進行に対するBM-MSCの効果。(A)24時間の血清涸渇後に $CM^{BM-MSC}$ で24時間処理したHCT-8/E11におけるサイクリンA、サイクリンE及びp27の発現レベルのウェスタンブロット評価。チューブリンをローディングコントロールとして使用した。(B)細胞サイクル進行に対する $CM^{BM-MSC}$ の効果。HCT-8/E11及びHCT 116細胞を50%コンフルエンスまで増殖させ、続いて24時間の血清涸渇に供し、 $CM^{BM-MSC}$ で24時間の処理した。細胞サイクルのG1、S及びG2ステージ(フローサイトメトリにより測定)にあるHCT-8/E11及びHCT 116細胞のパーセンテージを示す。

20

#### 【0019】

図11．免疫欠損マウスでヒトCRC細胞により樹立した腫瘍異種移植片におけるマウス及びヒトの間葉細胞の存在。ヒト及びマウスの両方の $\alpha$ -SMAを認識する抗体及びヒト特異的抗ビメンチン抗体を用いるパラフィン包埋HCT-8/E11又はHCT-8/E11+BM-MSC腫瘍切片のIHC。スケールバー、 $100 \mu\text{m}$ 。

図12．tNRG-1抗体の特異性。BLM細胞を、NRG-1のIg様ドメインを標的するNRG-1 siRNAでトランスフェクトした。tNRG-1発現は、「a」型細胞質テイル(最も豊富なバリエーション)に共通するNRG-1エピトープを指向するtNRG-1抗体を用いるウェスタンブロットティングにより分析した。

30

図13．tNRG-1を発現する間葉細胞は $\alpha$ -SMA陽性である。初代CRC(上パネル)及び肝臓転移(下パネル)におけるtNRG-1(左パネル)及び $\alpha$ -SMA(右パネル)IHC染色の代表例。

図14． $CM^{HCT-8/E11}$ は、Matrigelメンブレンを通過するBM-MSCの浸潤を刺激する。 $2 \times 10^4$ のBM-MSCを、下部コンパートメントにコントロール培地又は化学誘引剤としての $CM^{HCT-8/E11}$ を有するMatrigel被覆フィルター上に播種した。メンブレン下面の細胞をDAPIで染色した。スケールバー、 $100 \mu\text{m}$ (上段パネル)。蛍光画像を二値画像に変換し(中段パネル)、Image J分析を用いて浸潤細胞を計数した(下段パネル)。結果は、3つの独立実験の平均及び標準誤差として表す。P値はスチューデントのt検定を用いて算出した；統計学的に有意なP値を示す。

40

#### 【0020】

##### 発明の説明

本発明は、ヒト結腸直腸ガン患者のサンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞( $\alpha$ -平滑筋アクチン( $\alpha$ -SMA)の発現により特徴付けられる腫瘍関連線維芽細胞とも呼ばれる)における膜貫通1型ニューレグリン-1レベルの顕著な上昇が、腫瘍ステージ、浸潤深度及び5年無増悪生存率に関して、より不良な予後と有意に相関することを開示する。したがって、本発明は、

- 検査対象者から採取した生物学的サンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞における膜

50

貫通1型ニューレグリン-1のレベルを測定すること、及び

- 前記膜貫通1型ニューレグリン-1レベルを、対象者の健常組織サンプルから得た膜貫通1型ニューレグリン-1の参照レベルと比較すること

を含んでなり、ここで、

- 検査対象者のサンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞における膜貫通1型ニューレグリン-1レベルが前記健常組織のレベルと比較して顕著に上昇していることが、検査対象者がより不良な予後を有することを示す、検査対象者における結腸直腸ガンのインビトロ予後予測法に関する。

【0021】

換言すれば、本発明は、腫瘍関連間葉細胞に存在する膜貫通1型ニューレグリン-1の、結腸直腸ガンを有する患者の予後をインビトロで評価するためのバイオマーカーとしての使用に関する。より具体的には、本発明は、腫瘍関連間葉細胞における膜貫通1型ニューレグリン-1の、結腸直腸ガンを有する患者の予後をインビトロで評価するためのバイオマーカーとしての使用であって、患者から採取した生物学的サンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞における膜貫通1型ニューレグリン-1レベルが対象者の健常組織サンプルから得た膜貫通1型ニューレグリン-1の参照レベルと比較して顕著に上昇していることが、患者がより不良な予後を有することを示す、使用に関する。

10

【0022】

用語「バイオマーカー」は、正常な生物学的プロセス、正常な病原性プロセス又は治療的介入に対する正常な薬理的応答の指標として客観的に測定され評価される特徴を意味する。よって、バイオマーカーたる膜貫通1型ニューレグリン-1、より具体的には腫瘍関連間葉細胞中の膜貫通1型ニューレグリン-1は、とりわけ、1)転移し、周囲組織に深く浸潤し及び/又は低い5年無増悪生存率を生じる可能性のある結腸直腸ガンを診断するため；2)疾患の起こり得る過程又は疾患進行について、特に転移、疾患寛解、疾患再発、腫瘍再発及び死亡の確率に関しての予測を包含する結腸直腸ガンの予後を評価するため；3)どの治療(例えば、ニューレグリン-1及び/又はHER3活性の阻止に基づく治療)を患者に施すべきかを決定し、及び/又はどの患者が或る種の治療(例えば、HER1活性の阻止に基づくセツキシマブを用いる治療)に対して抵抗性であるかを決定するために、結腸直腸ガンを有する患者を治療上層別化するため；及び4)一旦、特定の治療が患者に施されると、疾患進行をモニターするために、使用することができる。

20

30

【0023】

よって、後者の予後予測は、患者がニューレグリン-1及び/又はHER3活性の阻止に基づく治療の利益を享受することを示す。よって、この予後予測は、患者が組合せ治療(例えばペルツズマブとセツキシマブとの組合せ治療)の利益を享受するかどうか予測することにより、結腸直腸ガン治療を微調整するために役立つ。セツキシマブ及びパニツムマブはHER1に結合する一方、ペルツズマブはHER2/HER3二量体化を阻害し、よってHER3チロシンキナーゼ活性を妨げる。したがって、HER1インヒビターを用いる治療に対して抵抗性である患者は、HER3インヒビターを用いる治療又はHER1インヒビター及びHER3インヒビターの両方を用いる組合せ治療の利益を享受する可能性がある。このように、本発明は、HER1活性の阻止に基づく治療に対する抵抗性の予測に関する。

40

【0024】

よって、本発明は、具体的には、予後予測が、結腸直腸ガンを有する患者がニューレグリン-1活性及び/又はHER3のチロシンキナーゼ活性の阻止に基づく治療の利益を享受するかどうかの判定又は決定を包含し、患者のサンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞における膜貫通1型ニューレグリン-1レベルが健常組織のレベルと比較して顕著に上昇していることが、患者がニューレグリン-1活性及び/又はHER3のチロシンキナーゼ活性の阻止に基づく治療の利益を享受することを示す、上記インビトロ法に関する。したがって、本明細書はまた、腫瘍関連間葉細胞に存在する膜貫通1型ニューレグリン-1の、結腸直腸ガンを有する患者がニューレグリン-1活性及び/又はHER3のチロシンキナーゼ活性の阻止に基づく治療の利益を享受するかどうかを決定するための使用を開示する。より具体的には

50

、本発明はまた、腫瘍関連間葉細胞における膜貫通1型ニューレグリン-1の、結腸直腸ガンをも有する患者がニューレグリン-1活性及び/又はHER3のチロシンキナーゼ活性の阻止に基づく治療の利益を享受するかどうかを決定するための使用であって、患者から採取した生物学的サンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞における膜貫通1型ニューレグリン-1レベルが対象者の健常組織サンプルから得た膜貫通1型ニューレグリン-1の参照レベルと比較して顕著に上昇していることが、患者がニューレグリン-1活性及び/又はHER3のチロシンキナーゼ活性の阻止に基づく治療の利益を享受することを示す使用に関する。

【0025】

また、本明細書は、

- 患者から採取した生物学的サンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞における膜貫通1型ニューレグリン-1のレベルを測定すること、及び

- 該膜貫通1型ニューレグリン-1レベルを、対象者の健常組織サンプルから得た膜貫通1型ニューレグリン-1の参照レベルと比較すること

を含んでなり、ここで

- 患者のサンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞における膜貫通I型ニューレグリン-1レベルが前記健常組織のレベルと比較して顕著に上昇していることが、患者がニューレグリン-1活性及び/又はHER3のチロシンキナーゼ活性の阻止に基づく治療の利益を享受することを示す、結腸直腸ガンをも有する患者がニューレグリン-1活性及び/又はHER3のチロシンキナーゼ活性の阻止に基づく治療の利益を享受するかどうかを決定する方法を開示する。

【0026】

また、本明細書は、ニューレグリン-1活性及び/又はHER3のチロシンキナーゼ活性を阻止することを含んでなる、患者において結腸直腸ガンを治療する方法であって、前記患者は、該患者から採取した生物学的サンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞における膜貫通1型ニューレグリン-1のレベルが対象者の健常組織サンプルから得た膜貫通1型ニューレグリン-1の参照レベルと比較して顕著に上昇している、方法を開示する。

また、本明細書は、ニューレグリン-1活性インヒビター及び/又はHER3チロシンキナーゼ活性インヒビターの、患者における結腸直腸ガンを治療するための医薬の製造についての使用であって、前記患者は、該患者から採取した生物学的サンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞における膜貫通1型ニューレグリン-1のレベルが対象者の健常組織サンプルから得た膜貫通1型ニューレグリン-1の参照レベルと比較して顕著に上昇している、使用を開示する。

【0027】

また、本明細書は、患者における結腸直腸ガン治療に使用するニューレグリン-1活性インヒビター及び/又はHER3チロシンキナーゼ活性インヒビターであって、前記患者は、該患者から採取した生物学的サンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞における膜貫通1型ニューレグリン-1のレベルが対象者の健常組織サンプルから得た膜貫通1型ニューレグリン-1の参照レベルと比較して顕著に上昇している、インヒビターを開示する。

【0028】

よって、本発明はまた、予後予測が、結腸直腸ガンをも有する患者がHER1活性の阻止に基づく治療に対する抵抗性を有するか又は発症したかの判定又は決定を包含し、患者のサンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞における膜貫通1型ニューレグリン-1レベルが健常組織のレベルと比較して顕著に上昇していることが、患者がHER1のチロシンキナーゼ活性の阻止に基づく治療に対する抵抗性を有することを示す、上記インビトロ法に関する。したがって、本明細書はまた、腫瘍関連間葉細胞における膜貫通1型ニューレグリン-1の、結腸直腸ガンをも有する患者におけるHER1活性の阻止に基づく治療に対する抵抗性をインビトロで予測するための使用を開示する。より具体的には、本発明はまた、腫瘍関連間葉細胞における膜貫通1型ニューレグリン-1の、結腸直腸ガンをも有する患者におけるHER1活性の阻止に基づく治療に対する抵抗性をインビトロで予測するための使用であって、患者から採取した生物学的サンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞における膜貫通I型ニュー

10

20

30

40

50

ーレグリン-1レベルが対象者の健常組織サンプルから得た膜貫通1型ニューレグリン-1の参照レベルと比較して顕著に上昇していることが、患者がHER1活性の阻止に基づく治療に対する抵抗性を有することを示す、使用に関する。

【0029】

また、本明細書は、

- 患者から採取した生物学的サンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞における膜貫通1型ニューレグリン-1のレベルを測定すること、及び
- 該膜貫通1型ニューレグリン-1レベルを、対象者の健常組織サンプルから得た膜貫通1型ニューレグリン-1の参照レベルと比較すること

を含んでなり、ここで

- 患者のサンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞における膜貫通I型ニューレグリン-1レベルが前記健常組織のレベルと比較して顕著に上昇していることが、患者がHER1活性の阻止に基づく治療に対して抵抗性を有することを示す、結腸直腸ガンを有する患者におけるHER1活性の阻止に基づく治療に対する抵抗性を予測する方法を開示する。

【0030】

用語「生物学的サンプル」は、原発腫瘍サンプル(結腸直腸ガン組織又は生検とも呼ぶ)、循環性間葉前駆体細胞又は生物学的流体(例えば、血液、血清、血漿、リンパ液、尿、唾液若しくは他の任意の分泌液又はそれらの誘導物)に関する。種々のサンプルを回収する方法は当該分野において周知である。本発明は、具体的には、生物学的サンプルが検査対象者又は結腸直腸ガンを有する患者から採取した結腸直腸ガン組織である上記インビトロ法に関する。

用語「ニューレグリン-1」は、ヒレグリンとしても知られ、オルターナティブスプライシングの結果としての少なくとも7つの異なるイソフォームを有するI型ニューレグリン-1に関する(37, 38)。

ニューレグリン-1タンパク質は、(しばしば、膜の一部として、より具体的には膜貫通タンパク質として)細胞内で、又は分泌(可溶)形態として細胞外で検出され得ることに留意すべきである。可溶形態は、当該膜貫通タンパク質の、プロテアーゼ(例えば、腫瘍壊死因子変換酵素(TACE))により切断される細胞外部分に相当し得る。

【0031】

用語「膜貫通1型ニューレグリン-1(tNRG-1)」又は「1型ニューレグリン-1前駆体」は、具体的には膜の一部として、より具体的には膜貫通タンパク質として、細胞内で検出され得る1型ニューレグリン-1タンパク質に関する。

上記のように、本発明は、膜貫通1型ニューレグリン-1が検査対象者又は結腸直腸ガンを有する患者の生物学的サンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞において測定されるインビトロ法に関する。

用語「腫瘍関連間葉細胞(T-MC)」又は「腫瘍関連線維芽細胞」又は「筋線維芽細胞」とは、新生物性細管又は腺の周囲に存在し得る紡錘状間葉細胞をいう。これらは、-平滑筋アクチン(-SMA)の発現により特徴付けられる。これらは骨髄由来であるか、又はヒト身体内の他の区画及び組織から動員され得る。

用語「検査対象者のサンプル中に存在する腫瘍関連間葉細胞における膜貫通1型ニューレグリン-1レベルが健常組織のレベルと比較して上昇している」とは、どの膜貫通1型ニューレグリン-1レベルを測定したか及び該レベルをどのように測定したかに依存する。用語「対象者の健常組織サンプルから得た膜貫通1型ニューレグリン-1の参照レベル」とは、対象者の健常組織サンプルで測定した膜貫通1型ニューレグリン-1レベルをいい得る。

【0032】

「健常組織」は、「コントロールサンプル」又は「健常患者又は健常組織(例えば、検査対象者又は結腸直腸ガンを有する患者から採取した健常組織)から採取した上記のような類似生物学的サンプル」を意味する。

膜貫通1型ニューレグリン-1のレベルは、膜貫通1型ニューレグリン-1タンパク質の

10

20

30

40

50

発現又はニューレグリン-1の核酸(例えば、mRNA)発現を測定することにより決定し得る。タンパク質レベル及び核酸レベル(例えば、mRNAレベル)の測定は当該分野において周知であり、ウェスタンブロット、ノーザンブロット、サザンブロット、ELISA、免疫沈降、免疫蛍光、フローサイトメトリ、免疫組織化学、核酸ハイブリダイゼーション技法、核酸逆転写法、及び核酸増幅法(例えばqPCR)を含むがこれらに限定されない当該分野において公知の任意の方法により行うことができる。このような技法は、例えば、US 2007/0218512に詳述されている。具体的実施形態では、バイオマーカーの発現は、バイオマーカータンパク質を特異的に指向する抗体を用いてタンパク質レベルで検出する。これら抗体は、種々の方法、例えばウェスタンブロット、ELISA、免疫沈降又は免疫組織化学で使用することができる。同様に、腫瘍組織の免疫染色は、臨床情報の評価、従来 of 予後予測法、及び当該分野で公知の他の分子マーカーの発現と組み合わせることができる。

10

#### 【0033】

本発明は、具体的には、腫瘍関連間葉細胞における膜貫通1型ニューレグリン-1が凍結サンプルでの免疫組織化学により測定される上記インビトロ法に関する。本発明は、具体的には、健常患者又は健常組織の凍結サンプルにおける膜貫通1型ニューレグリン-1発現と比較して、膜貫通1型ニューレグリン-1レベルの顕著な上昇が、より不良な予後を有するガン患者の凍結サンプル中の腫瘍関連間葉細胞で見出されることを開示する。上記のような凍結サンプルでの免疫組織化学に特に有用で、特異性に関して妥当な抗体は、Santa Cruz Biotechnology(CA)又はAtlas Antibodies AB(Stockholm, Sweden)から入手可能なウサギポリクローナル抗tNRG1である。

20

更に、本発明は、具体的には、サンプル内の腫瘍関連間葉細胞の25%以上が膜貫通1型ニューレグリン-1染色を含むとき、腫瘍関連間葉細胞における膜貫通1型ニューレグリン-1レベルが顕著に上昇しているとする上記インビトロ法に関する。用語「25%以上」は、腫瘍関連間葉細胞の25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95又は100%が膜貫通1型ニューレグリン-1について明らかに可視の特異的染色を含むことを示す。

#### 【0034】

用語「より不良な予後」は、患者が国際対ガン連合(Union for International Cancer Control)に従うガンステージ(表1)でより高いステージに属する見込みが顕著に上昇し、及び/又は腫瘍浸潤深度が増大する見込みが顕著に上昇し、及び/又は無増悪生存率が減少する見込みが顕著に上昇することを示す。

30

#### 【0035】

【表 1】

表 1：結腸直腸ガンについてのTNMステージ決定システム((39)から改変)

<b>原発腫瘍(T)</b>		
T <sub>x</sub>	原発腫瘍を評価できない	
T <sub>is</sub>	原位置でのガン腫	
T <sub>1</sub>	腫瘍が粘膜下組織に浸潤	
T <sub>2</sub>	腫瘍が固有筋層に浸潤	
T <sub>3</sub>	腫瘍が固有筋層を通過して漿膜下組織に浸潤	
T <sub>4</sub>	腫瘍が他の器官又は構造を直接浸潤又は臓側腹膜を穿孔	10
<b>局所リンパ節(N)</b>		
N <sub>x</sub>	局所リンパ節を評価できない	
N <sub>0</sub>	局所リンパ節転移なし	
N <sub>1</sub>	1～3の局所リンパ節で転移	
N <sub>2</sub>	4以上の局所リンパ節で転移	
<b>遠位転移(M)</b>		
M <sub>x</sub>	遠位転移の存否を決定できない	
M <sub>0</sub>	検出される遠位転移なし	
M <sub>1</sub>	遠位転移を検出	
<b>群分けステージ及び5年生存率</b>		
<b>ステージ</b>	<b>TNM分類</b>	<b>5年生存率</b>
I	T <sub>1-2</sub> 、N <sub>0</sub> 、M <sub>0</sub>	>90%
IIA	T <sub>3</sub> 、N <sub>0</sub> 、M <sub>0</sub>	80%～85%
IIB	T <sub>4</sub> 、N <sub>0</sub> 、M <sub>0</sub>	70%～80%
IIIA	T <sub>1-2</sub> 、N <sub>1</sub> 、M <sub>0</sub>	65%～80%
IIIB	T <sub>3-4</sub> 、N <sub>1</sub> 、M <sub>0</sub>	50%～65%
IIIC	T <sub>1-4</sub> 、N <sub>2</sub> 、M <sub>0</sub>	25%～50%
IV	T <sub>1-4</sub> 、N <sub>0-2</sub> 、M <sub>1</sub>	5%～8%

【0036】

30

よって、本発明は、より不良な予後が国際対ガン連合に従うガンステージでより高いステージに属する見込みが顕著に上昇し、及び/又は腫瘍浸潤深度が増大する見込みが顕著に上昇し、及び/又は無増悪生存率が減少する見込みが顕著に上昇することに相当する上記インビトロ法に関する。

よって、結腸直腸ガンを有する患者のサンプル中の腫瘍関連間葉細胞における膜貫通1型ニューレグリン-1レベルを測定するアッセイを行うための試薬を含んでなるキットが、本発明の実施に有用である。このアッセイは、患者の生検、原発ガンサンプル若しくは循環性間葉前駆体細胞についてのニューレグリン-1免疫組織化学アッセイ若しくは定量RT-PCRアッセイ又は患者の生物学的流体についてのサンドイッチ型ELISAであり得る。好ましくは、アッセイは、膜貫通1型ニューレグリン-1の免疫組織化学アッセイである。用語「キット」とは、膜貫通1型ニューレグリン-1の発現を特異的に検出するアッセイを行うための少なくとも1つの試薬(例えば、抗体、核酸プローブなど)を含んでなる任意の製品(例えば、パッケージ又は容器)をいう。キットには、本発明に従って用いる試薬の活性及び正確な使用を検証するために、ポジティブ及び/又はネガティブコントロールが含まれ得る。コントロールの設計及び使用は標準であり周知である。

40

本発明を更に説明するために、下記の非限定的実施例を示す。

【実施例】

【0037】

実施例

実施例 1

50

## 材料及び方法

## 細胞培養

ヒトBM-MSCは、記載(40)されたように、10人のガンを有さない患者から心臓手術前に得た胸骨BM吸引液から単離した。BM-MSCは、10%ウシ胎仔血清(FBS)、ペニシリン(100U/ml)及びストレプトマイシン(100 µg/ml)を含有する低グルコース-ダルベッコ改変イーグル培地(LG-DMEM)(Invitrogen, Carlsbad, CA)で培養し、37 °Cにて空气中5%CO<sub>2</sub>でインキュベートした。培地は週に2回新しくした。BM-MSCは8継代まで使用した。

ヒトT-MCは、治療目的の外科的切除を受けた3人の結腸腺ガン患者のCRC組織から単離した。正常組織由来間葉細胞(N-MC)は、同じ患者において、腫瘍から少なくとも5cmの距離の近傍正常結腸直腸組織から得た。簡潔には、組織断片を小片(2~3mm<sup>3</sup>)に切断し、6ウェルプレートに移し、抗生物質を補充した100 µlのFCSを各断片の上に加えた。培養物を37 °Cにて空气中10%CO<sub>2</sub>で24時間インキュベートした。24時間後、10%FBSを含有するLG-DMEMを各ウェルに加えた。培地を3~4日毎に新しくした。3~6日後に細胞の成長を観察した。15日後、接着性細胞を、トリプシン-EDTA(0.25% - 1mM)溶液(Invitrogen)でトリプシン処理して25cm<sup>2</sup>組織培養フラスコに移した。

## 【0038】

図9において、BM-MSC及びT-MCを位相差顕微鏡観察により比較し、FACSAria(登録商標)(BD Biosciences, San Diego, CA)でCD73、CD90及びCD105の存在並びにCD34、CD45、CD11b、CD19及びHLA-DRの不存在についてフローサイトメトリにより分析した。機能的同定キット(R&D Systems, Minneapolis, MN)を製造業者の指示に従って用いて、脂肪細胞、骨細胞及び軟骨細胞へ分化する能力により細胞を試験した。

ヒトCRC細胞株HCT-8/E11は、以前に記載(41)されたように得た。CRC細胞株HCT 116、SW480、HT-29、LoVo及びT84並びにBLMメラノーマ細胞株はATCC(Manassas, VA)から購入した。全てのガン細胞株を、10%FBS及び抗生物質(ペニシリン/ストレプトマイシン)を補充したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)(Invitrogen)で維持し、37 °Cにて空气中10%CO<sub>2</sub>でインキュベートした。緑色蛍光タンパク質(peGFP-C1; Clontech, BD Biosciences)を過剰発現するHCT-8/E11細胞(HCT-8/E11-GFP)をエレクトロポレーション(Cell line nucleofector kit V, Lonza, Basel, Switzerland)により作製し、安定細胞株をG418(1mg/ml)で選択した。HER1、HER2、HER3、AKT及びNRG-1を標的する小干渉RNA(siRNA)並びにスクランブルRNAiネガティブコントロールは、Qiagen(Venlo, The Netherlands)から購入し、エレクトロポレーションによりトランスフェクトした。(siHER1標的 = 5'-TAC GAA TAT TAA ACA CTT CAA-3'及び5'-ATA GGT ATT GGT GAA TTT AAA-3'、siHER2標的 = 5'-CAC GTT TGA GTC CAT GCC CAA-3'、siHER3標的 = 5'-CTT CGT CAT GTT GAA CTA TAA-3'、siAKT標的 = 5'-CAC GCT TGG TCC CGA GGC CAA-3'、siNRG-1標的 = 5'-TCG GCT GCA GGT TCC AAA CTA-3')。

## 【0039】

## 抗体及び試薬

ヒトエピトープに対する以下の一次抗体を使用した：ウサギポリクローナル抗HER1、抗HER2、抗HER3、抗tNRG-1、マウスモノクローナル抗BAX、抗BCL-2(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、ウサギモノクローナル抗ホスホ-AKT(p-AKT)(S473)、抗p-BAD(S136)、抗p-HER3(Y1289)、ウサギポリクローナル抗AKT、抗BAD、抗p-HER1(Y1068)(Cell Signalling Technology, Danvers, MA)、マウスモノクローナル抗チューブリン(Sigma-Aldrich, St.-Louis, MO)、ウサギポリクローナル抗p-HER2(Y1196及びY1248)、ヤギポリクローナル抗NRG-1 EGFドメイン、抗NRG-1 EGFドメイン、マウスモノクローナル抗p-チロシン(p-Tyr)、抗p27(R&D Systems)、ウサギポリクローナル抗Ki67(NeoMarker, Fremont, CA)、マウスモノクローナル抗PARP(BD Biosciences)、マウスモノクローナル抗サイクリンE(Invitrogen)、マウスモノクローナル抗サイクリンA(Zymed Laboratories, San Francisco, CA)、マウスモノクローナル抗α-SMA(Biogenex, San Ramon, CA)及びマウスモノクローナル抗ビメンチン(Menarini Diagnostics, Zaventem, Belgium)。フローサイトメトリでの免疫表現型決定のため、以下のマウス及びヒトモノクローナル抗体(Ab)並びに同様に接合されたアイソタイプ適合コントロールAb(特に明記しない限り、全てBD Bioscience

sから入手)を使用した: CD73-フィコエリトリン(PE)、CD90-アロフィコシアニン(APC)、CD105-フルオレセインイソチオシアネート(FITC)(AbD Serotec, Oxford, UK)、CD45 ペリジニルクロロフィリン-Cy5(PerCP-Cy5)、CD34-PE-Cy7 CD19-PerCP、CD11b-PE及びHLA-DR-APC。LY294002はTocris Bioscience(Bristol, UK)から、ワートマニンはCalbiochem(Meu don, France)から、GSK2141795はGlaxoSmithKline(Research Triangle Park, NC)から購入した。ペルツズマブ(Omnitarg、2C4)及びトラスツズマブ(Herceptin)はGenentech Inc.(San Francisco, CA)から、ラパチニブ(GW572016)はGlaxoSmithKlineから、セツキシマブ(C225、Erbix)はImClone Systems Inc.(New York, NY)から提供を受けた。セイヨウワサビペルオキシダーゼに結合した二次抗体及びファロイジン-TRITCはSigma-Aldrichから購入した。組換えヒトNRG-1 EGFドメイン(rNRG-1)はR&D Systemsから提供を受けた。

10

## 【0040】

## 馴化培地(CM)の調製

175cm<sup>2</sup> フラスコ中の $1.5 \times 10^6$ のBM-MSC、T-MC又はN-MC細胞を、10mlの無血清LG-DMEMで3回洗浄し、37℃にて20mlの無血清LG-DMEMで48時間インキュベートした。CMを採集し、1,250gで5分間4℃にて遠心分離し、0.22µmフィルターに通した。CMをセントリプレッブチューブYM-3(Amicon, Millipore Corp., Bedford, MA)中で濃縮し、滅菌し、新鮮な無血清LG-DMEMで希釈した: 0.5mlのCMは、 $5 \times 10^5$ 細胞に由来する可溶性因子を含有していた。NRG-1涵濁CMはNRG-1免疫沈降により得た: CMを2.5µg/mlの抗NRG-1と2.5µg/mlの抗NRG-1 EGFドメインとの組合せと4℃にて一晩インキュベートした。CMからのヘパリン結合性因子は、ヘパリン-アガロースビーズ(Pierce, Rockford, IL)での沈降により得た。ヘパリン-アガロースビーズをヘパリン平衡緩衝液(10mM Tris、50mM NaCl、pH7.0)で洗浄し、CMと一晩インキュベートした。結合タンパク質をLaemmliサンプル緩衝液(1M Tris-HCl[pH6.8]、30%グリセロール、6%SDS、3%β-メルカプトエタノール、0.005%プロモフェノールブルー)で溶出させ、5分間95℃に加熱し、続いてスピニングカラムで遠心分離した。

20

## 【0041】

## 液体クロマトグラフィー-質量分析/質量分析(LC-MS/MS)

CMに由来するヘパリン結合性画分を、変性SDS緩衝液中NuPAGE 4%-20% Bis-Trisグラジエントゲル(Invitrogen)で泳動し、40%メタノール及び10%酢酸中0.5%クーマシーブリリアントブルー(Bio-Rad, Hercules, CA)で染色し、40%メタノール及び10%酢酸から構成される溶液中で脱染した。ゲルバンドを加工し、以前(42)に記載されたようにLC-MS/MSで分析した。生MS/MSファイルを、MASCOT DAEMONを用いるNIH MASCOT Cluster(43)に供した。データを、記載(42)されたようにUNIPROT-SPROTデータベースで検索した。各ペプチドの同定のため、MASCOTは、 $-10 \times \log_{10}(P)$  (式中、Pは実験データとデータベース配列との間で観察される適合がランダム事象である絶対確率である)として規定される、確率に基づくイオンスコアを知らせてくれる。各ペプチドを出力ファイルに含ませる有意性の閾値は、MASCOT同一性スコア閾値( $P < .05$ )を充足するか又は超える個々のイオンスコアである。MASS SIEVEを使用して、MASCOTのMS/MSデータを分析し、タンパク質節約レポート(protein parsimony reports)(<http://www.proteomecommons.org/dev/masssieve>)を作成した。2つの別個の実験で検出されたペプチドのみを考慮した。

30

40

## 【0042】

## ウェスタンブロットング及びRTKアレイ

Laemmli溶解緩衝液(0.125M Tris-HCl(pH=6.8)、10%グリセロール、2.3%ドデシル硫酸ナトリウム[SDS])を用いて細胞を採集した。ビオチン化(Pierce)により細胞表面タンパク質を単離した。リン酸化タンパク質の検出のために、細胞を70%コンフルーエンスに増殖させ、示したように15分間処理した。NP-40溶解緩衝液(リン酸緩衝化生理食塩水[PBS]中、1%Nonidet P-40[NP-40][Sigma-Aldrich]、1%Triton X-100[Bio-Rad])及び以下のプロテアーゼインヒビター: アプロチニン(10µg/ml)、ロイペプチン(10µg/ml)(ICN Bio medicals, Costa Mesa, CA)、フェニルメチルスルホニルフルオリド(1.72mM)、NaF(100mM)、NaVO<sub>3</sub>(500mM)及びNa<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>(500mg/ml)(Sigma-Aldrich)を用いて細胞を採集した。細胞

50

溶解物(25 µg)及びCM(20 µl)をLaemlliサンプル緩衝液中に懸濁し、95 °Cで5分間煮沸した。免疫沈降のために、NP-40溶解緩衝液及びプロテアーゼインヒビターを用いて細胞を採集した。抗ウサギ抗体をヒツジ抗ウサギIgGダイナビーズ(Invitrogen)に共有結合させた後、500 µgの細胞溶解物又はネガティブコントロールとしての正常ウサギIgG抗体(R&D Systems)と4 °Cにて2時間インキュベートした。免疫沈降物を溶解緩衝液で5回洗浄し、100 µlのLaemlli溶解緩衝液で溶出させ、95 °Cにて5分間煮沸した。サンプルをNuPAGE 4%-20% Bis-Trisグラジエントゲル(Invitrogen)上で泳動させ、ポリビニリデンフルオリドメンブレンに転写し、PBS中5%脱脂乳又はPBS中4%ウシ血清アルブミン(BSA)(リン酸化タンパク質については0.5%Tween-20を含む)においてブロックし、免疫染色した。Quantity One Program(Bio-Rad)を用いてスキャニングデンシトメトリーを行った。

10

ヒトPhospho-RTK Arrayキット(R&D Systems)を用いて、42の異なるRTK(R&D Systems)の相対チロシンリン酸化レベルを同時に検出した。

#### 【0043】

フローサイトメトリーによる細胞サイクルの分析

細胞サイクル分布の分析のために、DNA Reagent Kit(BD Biosciences)を製造業者の指示に従って使用した。細胞サイクルの進行は、HCT-8/E11細胞及びHCT 116細胞を50%コンフルエンスまで増殖させ、続いて血清飢餓に24時間供し、CM<sup>BM-MSc</sup>又は無血清コントロール培地で24時間処理することにより分析した。細胞をトリプシン処理により採集し、洗浄し、分析時まで緩衝液溶液中で凍結させた。細胞DNA含量は、FACSCantoフローサイトメータ(BD Biosciences)でモニターした。装置セットアップ及び品質制御にDNA QC粒子(BD Biosciences)を用いた。有糸分裂指数(mitotic index)は、ModFit LTソフトウェア(Verity Software House)を用いて算出した。

20

#### 【0044】

CRC組織及び近傍正常結腸直腸組織からの間質液の調製

CRC組織及び近傍正常結腸直腸組織からの間質液は、以前に記載されたように調製した(44)。簡潔には、約0.3gの新鮮な組織をPBS中に回収し、3mm<sup>3</sup>片に切断し、1.0mlのPBSを含む10ml円錐状プラスチックチューブ中に配置した。サンプルを、空气中10%CO<sub>2</sub>で37 °Cにて1時間インキュベートし、1,000rpmにて2分間遠心分離し、続いて上清を吸引した。サンプルを更に4 °Cにて3,500rpmで20分間遠心分離した。1~4mg/mlのタンパク質濃度を有する最終上清を機能実験に用いた。

30

#### 【0045】

細胞数の評価

細胞数に対するrNRG-1又はCMの効果を評価するため、合計9ウェルの播種細胞を各条件について計数した(3連サンプル×3回計数)。最初に、1×10<sup>4</sup>のCRC細胞を、6ウェルプレートで10%FCSを補充したDMEM中に播種した。24時間後、細胞を、無血清条件下に、示されたように処理した；培地を3日毎に交換した。各ウェル中の生存細胞の総数を、3日毎に9日間、Countess自動細胞計数器(Invitrogen)で計数した；死細胞を排除するため、トリパンブルー染色を使用した。

#### 【0046】

コラーゲン浸潤アッセイ

40

単一細胞コラーゲン浸潤アッセイ

コラーゲン浸潤アッセイは、以前に記載されたように行った(45)。簡潔には、1×10<sup>5</sup>のCRC細胞をI型コラーゲン被覆6ウェルプレートに播種し、10%FBS及び抗生物質を補充した5×10<sup>5</sup>のBM-MSc若しくはT-MCに由来するCM又はDMEMで、示したように処理した。

形態及びコラーゲン中への浸潤は、24時間後に分析し、形状係数([周長]<sup>2</sup>/[4面積])及び浸潤指数を用いて定量した。浸潤細胞及び非浸潤細胞の数を、倒立位相差顕微鏡(DMI 3000B; Leica, Wetzlar, Germany)で20×対物レンズ及び10×接眼レンズを用いてランダムに選択した10の顕微鏡視野において2人による盲検で計数した。浸潤指数は、各視野において、ゲルに浸潤した細胞数を計数した細胞総数で除した比として算出した。コラーゲンマトリクスを3%パラホルムアルデヒドで10分間固定し、記載されたとおりにファロイ

50

ジン-TRITC(Sigma-Aldrich)染色した(45)。細胞を、Zeiss 510 META共焦点レーザ走査顕微鏡(Carl Zeiss, Micro-imaging Inc., Heidelberg, Germany)で488アルゴン及び543 He Neレーザを用いて撮像した。Plan Achromat 63X/1.4油浸DIC又はPlan Achromat 100x/1.4油浸DIC対物レンズを用いて画像を取得した。示した全ての画像は、z-スタックを積み込んだものである(collapsed)。

#### 【0047】

##### ヘテロタイプスフェロイドコラーゲン浸潤アッセイ

コラーゲンI型溶液の底ゲル層(bottom gel layer)を $1 \times 10^6$ のBM-MSCと混合し、ゲル化させた。多細胞性スフェロイドを形成するため、50mlのErlenmeyerフラスコにおいて、6mlのDMEM+10%FCS中、1mlあたり $2 \times 10^5$ のHCT-8/E11 GFP細胞を、10%CO<sub>2</sub>で37℃にて72時間、70rpmの回転振盪器上で培養した。 $\pm 300 \mu\text{m}$ の直径を有するスフェロイドを使用した。コラーゲンI型溶液と混合したHCT-8/E11-GFPスフェロイドを、予め形成したBM-MS C含有ゲル層上に穏やかに注いだ。24時間毎に最大96時間、10のスフェロイドの明視野画像及びGFP蛍光画像をZeiss Axiovert 200M蛍光顕微鏡(Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany)で撮像した。ヘマトキシリン・エオシン(H&E)染色及びKi67染色のために、コラーゲンマトリクスを4%緩衝化ホルモル中で12時間固定し、続いてPBSで洗浄した。固定したマトリクスを、使用時まで、70%エタノールに移した。マトリクスをパラフィンに包埋し、切片にして、H&E又は抗Ki67で染色した。

#### 【0048】

##### マトリゲル浸潤アッセイ

ポリカーボネートメンブレンフィルター(6.5mm直径、8 $\mu\text{m}$ 孔サイズ)を備えたトランスウェルチャンバをマトリゲル(Matrigel)で被覆した。フィルターを、コントロール培地又は化学誘引剤としてのCM<sup>HCT-8/E11</sup>を含む6ウェルプレートに配置し、 $2 \times 10^4$ のBM-MSCをトランスウェルチャンバの上部区画に加えた。48時間後、綿棒で孔を通して浸潤しなかった細胞を除去した。メンブレン下面の細胞をDAPI(Sigma, 0.4mg/ml)で染色した。蛍光画像(Axiovert 200M; Carl Zeiss)を二値画像に変換し、コンピュータ制御のImage J分析によりフィルターあたり10の顕微鏡視野において浸潤細胞を計数した。

#### 【0049】

##### 動物試験

動物試験は、ヘント大学医学健康科学部の学部動物実験倫理委員会(Local Ethical Committee for Animal Experiments, Faculty of Medicine and Health Sciences, Ghent University, Belgium)により認可された。4週齢の雌性ヌ/ヌマウス(1群あたり10匹)(Charles River Laboratories, Brussels, Belgium)に、100 $\mu\text{l}$ の滅菌PBSに懸濁した $10^6$ のCRC細胞(HCT-8/E11、SW480及びHCT 116)を、単独で又は $2 \times 10^6$ のBM-MSCと組み合わせて皮下(s.c.)接種した。腫瘍形成に対する可溶性因子の効果を評価するために、マウスに、 $2.5 \times 10^6$ のBM-MSCに由来する100 $\mu\text{l}$ の滅菌CM又はコントロール培地中の $10^6$ のガン細胞をs.c.接種した。この実験のため、CM(50 $\mu\text{l}$ )の腫瘍内注射を3日毎に行った。BM-MSC誘導腫瘍形成に対するペルツズマブの効果を評価するため、 $10^6$ のHCT-8/E11細胞を、単独で又は $2 \times 10^6$ のBM-MSCと組み合わせてs.c.注射した。1週間後、マウスに、週に3回、ピヒクル(PBS)のみ又はペルツズマブ(600 $\mu\text{g}$ /マウス)を腹腔内(i.p.)注射した。腫瘍容積は、式： $V = 0.4 \times a \times b^2$  (式中、Vは容積であり、aは腫瘍の長軸長であり、bは腫瘍の短軸長である)を用いて見積もった。動物は、研究に脊椎動物を使用するための規定に則って、腫瘍が約1~1.5cm<sup>3</sup>になったとき屠殺した。原発腫瘍を摘出し、秤量し4%緩衝化ホルモル中で12時間固定し、続いてPBSで洗浄した。固定腫瘍は、使用時まで、70%エタノールに移した。腫瘍をパラフィンに包埋し、切片にして、H&Eで染色した。TUNEL、抗-SMA(Biogenex)、抗ビメンチン及び抗Ki67抗体を用いる免疫組織化学(IHC)を、NexES自動スライド染色システム(Ventana Medical Systems, Tucson, AZ)を使用してパラフィン切片で行った。細胞増殖(Ki67陽性)は、細胞株あたり2つの原発腫瘍の12画像にわたって平均した、高倍率視野あたりの陽性ガン細胞の%として定量した。

#### 【0050】

### 定量リアルタイムPCR(qRT-PCR)

Trizol試薬(Invitrogen)を製造業者のプロトコルに従って用い、細胞のトータルRNAを単離した。RNAをDNaseキット(DNAフリー)で製造業者(Applied Biosystems, Austin, TX)のプロトコルに従って処理し、残る全てのDNAを除去した。RNAの濃度及び純度は、Nanodrop ND-1000(Nanodrop Technologies, Wilmington, DE)で測定した。高容量RNA-to-cDNAキット(Applied Biosystems)を製造業者のガイドラインに従って用いて一本鎖cDNAを合成した。定量リアルタイムPCRを、ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System(Applied Biosystems)で、NRG1(Assay ID Hs00247620\_m1)及びコントロール遺伝子B2M(Assay ID Hs00984230\_m1)について100ngのcDNA、Taqman遺伝子発現マスターミックス試薬及びAssay-On-Demand(Applied Biosystems)を用いて、比較CT法(DDCT)で行った。サイクル条件は、50

10

#### 【0051】

### 患者サンプル及び免疫組織化学

原発CRC組織(n=54人の被検者；男性26人、女性28人；年齢41~94歳)、近傍正常結腸直腸組織(n=4)、肝臓転移(n=3)及び近傍正常肝臓組織(n=3)を、1996年8月~2000年3月の間に、アントワープ大学病院(University Hospital Antwerp)で集めた。書面によるインフォームドコンセントを大学倫理委員会の推奨に従って各患者から得た。

組織を切除直後に液体窒素で素早く凍結し、-80℃で保存した。腫瘍ステージ決定は、国際対がん連合(UICC)に従って行った：10の腫瘍をステージI( $T_{1-2}N_0M_0$ )、15の腫瘍をステージII( $T_{3-4}, N_0, M_0$ )、21の腫瘍をステージIII( $T_{1-4}, N_{1-2}, M_0$ )、8つの腫瘍をステージIV( $T_X, N_X, M_1$ )とした。対象は手術時であった。全原発腫瘍の包括的リストを表2に示す。

20

#### 【0052】

tNRG-1 IHCを凍結切片で行った。凍結組織を金属ブロック上でOptimal Cutting Temperature(OCT)コンパウンドに包埋し、5µm凍結切片を正荷電スライド上に切り出し、風乾させ、メタノール中で10分間固定した後、再度風乾させた。連続切片を10%正常ヤギ血清でブロックし、PBSでリンスし、10mM Tris-HCl(pH7.5)、150mM NaCl、0.01%(v/v) Tween 20、3%正常ヤギ血清及び0.1% BSAを含有する緩衝液中で1:250希釈(0.8µg/ml)のウサギポリクローナル抗tNRG-1(Santa Cruz)又は1:100希釈(100µg/ml)のマウスモノクローナル抗α-SMA(Biogenex)と室温にて1時間インキュベートした。ネガティブ染色コントロールとして、組織切片の別のスライドを一次抗体の不在下にPBS中でインキュベートした。PBSで洗浄後、全ての切片を、ビオチン化ヤギ抗ウサギ又は抗マウス二次抗体(1:400希釈)と室温にて45分間インキュベートし、続いて1:500希釈のストレプトアビジン-ビオチンペルオキシダーゼ溶液とインキュベートした。ジアミノベンジジン溶液中で発色させ、マイアのヘマトキシリン溶液で対比染色した。tNRG-1タンパク質のIHCシグナルを、染色細胞のパーセンテージ及びシグナル強度の両方を考慮してスコア決めした：(i)低スコア：間質細胞の25%未満でtNRG-1染色が弱い又はなし；(ii)高スコア：間質細胞の25%以上が強いtNRG-1細胞質及び原形質膜染色を含む。2人の観察者が、独立して、各患者サンプル5つの顕微鏡視野を100×の倍率で定量した。

30

#### 【0053】

### 統計分析

全ての統計計算を、MedCalc(Version 11.0；MedCalc Software, Mariakerke, Belgium)を用いて行った。比較は、個々の時点で、反復測定二元配置分散分析(ANOVA)検定、続いてスチューデントのt検定(ヘテロタイプスフェロイドカラーゲン浸潤アッセイにおける面積及び形状係数、細胞数並びに腫瘍容積)、正規分布についてのダゴスティノ-ピアソン検定の後の対応のない両側スチューデントt検定(マトリゲル浸潤、Ki67増殖指数及びTUNELアポトーシス指数)、カイ二乗検定(浸潤指数)又はマンホイットニー検定(単一細胞カラーゲン浸潤アッセイにおける形状係数、腫瘍重量)を用いて行った。正常組織対腫瘍組織のtNRG-1発現の比較及び5年PFSとのtNRG-1の関連は、カイ二乗検定を用いて行った。臨床病理学的パラメータとのtNRG-1の関連は、傾向についてのカイ二乗検定により分析

40

50

した。示した全てのデータは、少なくとも3つの独立実験を代表し、平均及び標準誤差として表す。全ての統計検定は両側検定であった。 .05未満のP値を統計学的に有意であると見なした。

【0054】

結果

ヒトCRC細胞の浸潤、生存及び腫瘍形成におけるBM-MSCの役割

CRC細胞に対するナイーブなBM-MSCに由来する可溶性因子の機能的効果を調べるため、コラーゲン浸潤実験を行った。HCT-8/E11細胞、SW480細胞及びHCT 116細胞をコラーゲンI型ゲル上に播種した；CM<sup>BM-MSC</sup>での処理は、CRC細胞HCT-8/E11、SW480及びHCT 116において浸潤伸長の形成を伴う顕著な形態学的変化を誘導した(図1A、上パネル)。24時間処理後、伸長した浸潤CRC細胞の数は、CM<sup>BM-MSC</sup>での刺激により2.4~5.5倍高くなった(HCT-8/E11についてはP=.002、HCT 118についてはP=.008、SW480についてはP=.006、カイ二乗検定)(図1A、下パネル)。ファロイジン-TRITCでのF-アクチン染色より、HCT-8/E11細胞について、コントロール条件下では丸みを帯びた外観、CM<sup>BM-MSC</sup>での処理後には複数の突起を有する細長い形態が明らかになった(図1B、右パネル)。CM<sup>BM-MSC</sup>処理HCT-8/E11細胞の平均形状係数は、コントロールの1.8倍であり、統計学的に有意な拡張を示した(P=.001；マンホイットニー検定)(図1B、左パネル)。

【0055】

コラーゲンI型ゲルにおけるBM-MSCとHCT-8/E11-GFPスフェロイドとの共培養(スフェロイドとBM-MSCとの間に物理的接触なし)により、HCT-8/E11-GFPスフェロイドは、経時的に、(形状係数で測定される)不規則性が高くなり、突出部表面積が増大することが示された(図1C、D及びE)(P<.001、反復測定二元配置ANOVA)。スフェロイドの形状係数は、0時間で1.4±0.2の当初平均値であった(ほぼ円形であることを示す)。96時間で、スフェロイドの形状係数は、コントロールでは2.5±0.1であり、これに対し共培養物では4.5±0.4であった(差=2.0、差の95%信頼区間CI=0.9~3.0、P=.002、スチューデントのt検定)(図1D、左パネル)。共焦点顕微鏡観察でのF-アクチン構造の検査により、コントロールのスフェロイドは、滑らかな縁を有し、時折浸潤伸長を形成している(図1D、右パネル)一方、共培養物中のスフェロイドは不規則な周縁を有し、細胞が周囲のコラーゲンマトリクスに浸潤していることが明らかになった。スフェロイドの面積は、BM-MSCとの24時間の共培養後に有意に高くなった(差=6631、差の95%CI=2965~10297、P=.002、スチューデントのt検定)。96時間で、スフェロイドの面積は、共培養条件下で2倍高くなった(差=60488、差の95%CI=46181~74796、P<.001、スチューデントのt検定)(図1E、左パネル)。96時間で、表面積は共培養条件で大きかったにも関わらず、Ki67増殖指数に、コントロール条件と共培養条件との間で差はなかった(差=4.5、差の95%CI=-15.5~6.5、P=.382、スチューデントのt検定)(図1E、右パネル)。

【0056】

CM<sup>BM-MSC</sup>が細胞生存及び腫瘍形成に影響するかどうかを更に調べた。組織培養基質に播種したCRC細胞のCM<sup>BM-MSC</sup>での処理により、細胞数が経時的に有意に増大した(HCT-8/E11についてはP=.001；HCT 116についてはP<.001；SW480についてはP=.006、反復測定二元配置ANOVA検定)(図2A、左パネル)。CM<sup>BM-MSC</sup>処理の特徴は、HCT-8/E11細胞について示されたように、細胞アイランド上に重層した多くのドーム様巣が形成され、相対的に浮遊細胞が存在しなくなることであった(図2A、右パネル)。CM<sup>BM-MSC</sup>による細胞数の増大は細胞サイクルの進行に起因するものではなかった。なぜならば、正及び負の細胞サイクル調節因子(サイクリンA/E及びp27)の発現変化は見出されなかったからである(図10A)。したがって、細胞サイクルの分析により、CM<sup>BM-MSC</sup>処理したHCT-8/E11細胞及びHCT 116細胞並びにそれぞれのコントロールで、細胞サイクルのG1相、S相及びG2/M相の細胞が同様に分布していることが証明された(図10B)。ガン細胞の増殖は細胞生存の増大に起因し得るので、CM<sup>BM-MSC</sup>がアポトーシスから保護するかどうかを調べた。CM<sup>BM-MSC</sup>は、S136リン酸化及び細胞死遂行タンパク質(cell death-executing protein)BAD(46)の不活化を通じて、S473ホスホ-AKT(p-AKT)量及び生存促進AKTキナーゼ活性を刺激した(図2B)。CM<sup>BM-MSC</sup>処

理したCRC細胞は、低いBAX発現レベル及び安定なBCL-2発現を示した(このことにより、BAX/BCL-2比が減少し、CM<sup>BM-MSc</sup>-処理細胞のアポトーシスに対する感受性が低くなる)(図2B、右上パネル)(47)。CM<sup>BM-MSc</sup>の抗アポトーシス効果は、CM<sup>BM-MSc</sup>に曝露されたHCT 116細胞でPARP切断が減少することにより更に確認された(図2B、右下パネル)。

#### 【0057】

インビボでのCRC細胞の細胞生存及び腫瘍形成に対するBM-MSc又はその可溶性因子の直接的役割を更に確認するために、 $1 \times 10^6$ のHCT-8/E11、SW480又はHCT116細胞を単独で又は $2 \times 10^6$ のBM-MSc若しくはCM<sup>BM-MSc</sup>との混合でスイスnu/nuマウスにs.c.移植した。BM-MSc及びCM<sup>BM-MSc</sup>は、CRC細胞の腫瘍獲得(図2C)及び腫瘍成長を促進した(HCT-8/E11について $P < .001$ ; HCT 116について $P = .036$ ; SW480について $P = .001$ 、反復測定二元配置ANOVA検定)(図2D及びE)。 $2 \times 10^6$ のBM-MSc単独のs.c.注射は腫瘍を形成しなかった(図2C)。顕著なことには、BM-MScは全てのCRC細胞について約10倍の腫瘍成長を刺激し、腫瘍重量は平均34倍増であった(図2F)(HCT-8/E11について $P < .001$ ; HCT 116及びSW480について $P = .004$ ; マンホイットニー検定)。腫瘍形成増大の機序を調べるため、接種の最初の2週間以内に腫瘍の一部を回収した。コントロール及びBM-MSc促進化腫瘍における生存領域は、Ki67染色で明らかのように、細胞サイクルに付随性変化を有さなかった(差=4.0、差の95%CI=-5.6~13.6、 $P = .375$ 、スチューデントのt検定)(図2G、上パネル)。対照的に、コントロール異種移植片で、広範囲の細胞壊死、及びBM-MSc異種移植片と比較して顕著により多くの細胞がアポトーシスを起こしたことを示すTUNEL染色のアップレギュレーションが見い出された(差=8.2、差の95%CI=5.0~11.4、 $P < .001$ ; スチューデントのt検定)(図2G、下パネル)。加えて、共接種したBM-MScは、異種移植片で注射後6週間まで生存し、(HCT-8/E11細胞が発現できない)ヒトビメンチンに特異的な抗体を用いるIHCで証明されるように、腫瘍容積の10%までを構成した。興味深いことに、腫瘍容積の別の10%は、ヒトビメンチンについて陰性である平滑筋アクチン(-SMA)陽性間葉細胞の存在で証明されるように、マウス起源の間葉細胞が浸潤していた(図11)。これら実験は、腫瘍容積の大幅な増大が主としてガン細胞数の増加により引き起こされることを明確に証明している。

#### 【0058】

CRC細胞におけるHER3及びAKTのBM-MScによるパラクリン活性化

CM<sup>BM-MSc</sup>で処理したHCT-8/E11細胞における42の一連の異なるRTKの相対的チロシンリン酸化レベルを分析した(図3A)。スクリーニングにより、2つの二連免疫反応性スポット(p-HER3)で示されるように、HER3リン酸化レベルがCM<sup>BM-MSc</sup>処理後に10倍高くなることが明らかとなった。CM<sup>BM-MSc</sup>処理後のHER3チロシンリン酸化は、HER3免疫沈降に続くHRP接合ホスホ-チロシン(p-Tyr)抗体での検出により更に確認された(図3B)。

HER3は、Y1289を含む6つのチロシンを含有する、PI3Kのp85調節サブユニットの結合部位を有する。このことにより、HER3シグナル伝達は他のHERファミリーメンバーと区別される(48)。PI3Kの最も十分に特徴付けられた標的の1つはAKTキナーゼである。HER3/PI3K/AKT経路は、生存、細胞骨格再配置及び浸潤を調節する(49)。図3Cに示すように、CM<sup>BM-MSc</sup>は3つの別個のCRC細胞株においてY1289 p-HER3を刺激した。HER3は最低限の内在性(intrinsic)チロシンキナーゼ活性のみを有するので、そのリン酸化は、主に、他のHERファミリーメンバーとの物理的關係に依存する(50)。HER2は、全てのHERレセプターの優先的なヘテロ二量体化パートナーである(51)。42のRTKのスクリーニングにより、HER1及びHER2の両方がHCT-8/E11において基本活性を示すことが明らかになった。CM<sup>BM-MSc</sup>処理はHER1リン酸化レベルを変化させなかったが、総HER2リン酸化は中程度に増大した(図3A)。一致することに、ウェスタンブロッティングにより、CM<sup>BM-MSc</sup>処理に際してY1196及びY1248 p-HER2は増加するが、Y1068 p-HER1は変化しないことが明らかとなった(図3D)。

#### 【0059】

次に、HER3の活性化状態がHER1又はHER2との相互作用に依存するかどうかを、siRNA、HER中和抗体及び薬理的インヒビターを用いて調べた。図3Eに示されるように、単一siRNAによるHER2の一過性標的化は、HER2タンパク質を99%涸渇させ、CM<sup>BM-MSc</sup>誘導HER3活性

化の54%減少を伴った。このことは、HER3活性化がHER2発現レベルに依存することを示唆した。一致して、単一siRNAによるHER3の82%涵濁は、CM<sup>BM-MSC</sup>誘導HER3活性化の61%減少をもたらした。対照的に、プールしたsiRNAによるHER1の50%涵濁は、CM<sup>BM-MSC</sup>誘導HER3活性化に対して有意な効果を有さなかった。更に、AKT及びBADのリン酸化がHER3活性化に依存することを、HER特異的siRNAを用いて証明した。コントロールsiRNAは、CM<sup>BM-MSC</sup>誘導HER、AKT及びBADのリン酸化に対して効果を有さなかった。HER3活性化に機能的ヘテロ二量体が必要であることは、選択的HER中和抗体及び薬理的インヒビターで更に証明された(図3F)。HER2/HER3ヘテロ二量体形成を阻害する(52)ヒト化モノクローナル抗体(mAb)であるペルツズマブ及びHER3トランスリン酸化の低下を導く(53、54)HER1及びHER2チロシンキナーゼインヒビターであるラパチニブの添加は、HCT-8/E11細胞で、CM<sup>BM-MSC</sup>誘導HER3活性化をそれぞれ67%及び72%減少させた。異なるHER2エピトープに結合する別のヒト化mAbであるトラスツズマブ、その後のリガンド非依存性HER2二量体化及びシグナル伝達をブロックする(52、55)ペルツズマブ、及びHER1を標的とする(56)マウス-ヒトキメラmAbであるセツキシマブは、CM<sup>BM-MSC</sup>誘導HER3活性化を有意には低下させなかった。加えて、ペルツズマブ及びラパチニブは、CM<sup>BM-MSC</sup>処理細胞において、AKT活性化をそれぞれ79%及び82%低下させた一方、セツキシマブ及びトラスツズマブはAKT活性化をほんの僅かに低下させた。

#### 【0060】

BM-MSCによる膜貫通NRG-1(tNRG-1)前駆体の発現及び生物学的に活性なNRG-1の遊離

ウェスタンブロッティングは、「a」型細胞質テイル(最も豊富なバリエーション)に共通するNRG-1エピトープを指向する特異的抗tNRG-1抗体を用いて行った(図4A)。I型NRG-1(ヒレグリンとしても知られる(57-59))の分子量に相当する105kDaの免疫反応性バンドをBM-MSC(図4B、左パネル)及びポジティブコントロールBLM(37)で同定した。細胞表面での105kDa免疫反応性バンドの局在が、BM-MSCについてビオチン化により確認された(図4B、右パネル)。最も重要なことに、一連のヒトCRC細胞株(HCT-29、Caco-2、LoVo、HCT 116、T84及びSW480を含む)は、イムノブロットで、tNRG-1発現についてネガティブであった(データは示さず)。一致して、qRT-PCR分析により、この(非)発現レベルはmRNAレベルで検証された(図4C)。

CM<sup>BM-MSC</sup>のヘパリン結合性タンパク質について行ったプロテオミクス分析により、40~50kDa領域に質量分析で同定される4つの独特なNRG-1ペプチドの存在が確認された。図4Dに示されるように、これらペプチドは、NRG-1のヘパリン結合性Ig様ドメイン及び共通EGF(EGFc)ドメインに由来していた。NRG-1及びNRG-1 EGF様ドメインに対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、予測された40~44kDa領域に、おそらくグリコシル化の結果としての、2つの免疫反応性バンドが示された(図4E)(59、60)。

#### 【0061】

HER3チロシンリン酸化に対するCM<sup>BM-MSC</sup>の効力を定量するため、種々の濃度のrNRG-1で処理したHCT-8/E11細胞を比較した(図5A)。HER3のリン酸化は0.25ng/mlのrNRG-1で顕著であった。CM<sup>BM-MSC</sup>での処理は、±10ng/mlのrNRG-1と等価なHER3リン酸化をもたらした。加えて、rNRG-1(10ng/ml)処理は、HCT-8/E11細胞で、CM<sup>BM-MSC</sup>の効果に匹敵するHER2活性化を誘導した(図5B)。rNRG-1(10ng/ml)でのHCT-8/E11、HCT 116及びSW480細胞の処理は、形態学的変化(図5C)及びコラーゲンマトリクスへの浸潤を誘導した(HCT-8/E11についてP=.049; HCT 116についてP=.007; SW480についてP=.003、カイ二乗検定)(図5C)。rNRG-1の添加は、HCT-8/E11細胞数の用量依存的増加を誘導した(0.1ng/mlでP=.473; 1ng/mlでP=.087; 10ng/mlでP=.002; 反復測定二元配置ANOVA検定)(図5D、左パネル)。rNRG-1処理HCT-8/E11細胞は、S473 p-AKT及びS136 p-BADレベルの上昇(図5E、左上パネル)並びにBAX/BCL-2比の低下(図5E、右上パネル)を示した。更に、rNRG-1処理HCT 116細胞で、コントロールと比較してPARP切断の低下が観察された(図5E、右下パネル)。

CM<sup>BM-MSC</sup>誘導HER3及びAKT活性化を逆転させるNRG-1/1中和抗体とのCM<sup>BM-MSC</sup>の予備インキュベーションにより示されるように、生物学的に活性なNRG-1及びNRG-1は共に、BM-MSCが培養培地に放出した(図5F)。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 2 】

## BM-MSC媒介パラクリンNRG-1/HER3シグナル伝達の機能的役割

NRG-1/1中和抗体によるCM<sup>BM-MSC</sup>中のNRG-1涸渴は、CM<sup>BM-MSC</sup>誘導浸潤を82%阻害した一方、マウスIgGでの処理は浸潤を阻害しなかった( $P=.004$ 、カイ二乗検定)(図6A)。HER2又はHER3 siRNAでの処理は、CM<sup>BM-MSC</sup>誘導浸潤を有意に66~74%低下させた(siHER2について $P=.046$ 、siHER3について $P=.02$ 、カイ二乗検定)；HER2及びHER3 siRNAの組合せは相加応答を示さなかった。HER1 siRNAはCM<sup>BM-MSC</sup>誘導浸潤を有意には低下させなかった(図6B)( $P=.617$ 、カイ二乗検定)。ラパチニブ及びペルツズマブは、形状係数により測定されるように、CM<sup>BM-MSC</sup>誘導形態学的及び機能的応答(ラパチニブについて $P < .001$ 、ペルツズマブについて $P=.005$ 、マンホイットニー検定)及び浸潤(ラパチニブ及びペルツズマブについて $P=.025$ 、カイ二乗検定)をブロックした。他のHER中和抗体及びインヒビターで、CM<sup>BM-MSC</sup>誘導機能的応答に対する有意な効果は観察されなかった(浸潤指数：セツキシマブについて $P=.824$ 、トラスツズマブについて $P=.374$ 、カイ二乗検定；形状係数：セツキシマブについて $P=.333$ 、トラスツズマブについて $P=.153$ 、マンホイットニー検定)(図6C)。次に、CM<sup>BM-MSC</sup>誘導浸潤におけるPI3K/AKTの役割を調べた。ガン細胞をPI3Kインヒビター-LY294002、ワートマニン、汎AKTキナーゼインヒビター-GSK2141795、並びにAKT siRNAで処理した(図6D)。HCT-8/E11の基本浸潤を阻害しなかった薬剤濃度が、CM<sup>BM-MSC</sup>誘導浸潤をブロックできた(LY294002(10  $\mu$ M)について $P=.006$ 、ワートマニン(10  $\mu$ M)について $P=.033$ 、GSK2141795(0.1  $\mu$ M)について $P=.034$ 、GSK2141795(1  $\mu$ M)について $P < .001$ 、カイ二乗検定)。AKT siRNAでのHCT-8/E11細胞のトランスフェクションは、CM<sup>BM-MSC</sup>誘導浸潤を72%減少させた( $P=.021$ 、カイ二乗検定)(図6E)。

10

20

## 【 0 0 6 3 】

更に、HCT-8/E11細胞でのHER2-HER3二量体化及びシグナル伝達がBM-MSC増強生存及び腫瘍形成において本質的役割を演じているかどうかを調べた。ペルツズマブは、HCT-8/E11細胞について図7Aに示されるように、CM<sup>BM-MSC</sup>誘導CRC細胞生存を有意に減少させた( $P < .001$ 、反復測定二元配置ANOVA検定)。コントロール条件下でペルツズマブは統計学的に有意な効果を示さなかった( $P=0.715$ 、反復測定二元配置ANOVA)。一致することに、ペルツズマブ(600  $\mu$ g/マウス)のi.p.注射は、腫瘍容積の低下( $P=.035$ 、反復測定二元配置ANOVA検定)及び腫瘍重量の減少( $P=.004$ 、マンホイットニー検定)で証明されるように、HCT-8/E11細胞のBM-MSC増強腫瘍形成を有意に遅延させた(図7B)。ビヒクル処置マウスはこれら応答を示さなかった(図7C)。生存領域で、ペルツズマブ処理はKi67増殖指数に有意に影響しなかった(差=5.2、差の95% CI = -4.8~15.2、 $P=.276$ 、スチューデントのt検定)(図7D)。これらデータは、HCT-8/E11細胞のBM-MSC誘導腫瘍形成におけるHER2-HER3媒介生存シグナルの役割を示す。

30

## 【 0 0 6 4 】

## ヒトCRCにおけるtNRG-1の発現

原発CRC( $n=54$ )、近傍正常結腸直腸組織( $n=4$ )、肝臓転移( $n=3$ )及び近傍正常肝臓組織( $n=3$ )におけるtNRG-1の発現をIHCで調べた(図8A及びB並びに表2)。54のCRCのうち41(76%)及び3つの肝臓転移のうち3つ(100%)が高い間質性tNRG-1発現を示した。対照的に、tNRG-1発現は、近傍正常組織の間質(0/4；0%)( $P=.006$ ；カイ二乗検定)及びほとんどのCRC標本の上皮ガン細胞(47/54、87%)で陰性であった。間質性tNRG-1発現は、新生細管及び腺の周り、特に浸潤最前部の紡錘状間葉細胞に限定された(図8A、上パネル)。間葉細胞によるtNRG-1発現の頻度は、正常組織から腫瘍組織へ顕著に増大した。更に、原発腫瘍のtNRG-1染色パターンに勾配が観察され、ガン細胞を直接取り囲む間質で顕著に発現し、腫瘍周囲間質の遠位部分で発現は僅かであるか又はなかった。対照的に、活性化腫瘍関連間葉細胞又は筋線維芽細胞のマーカーたる $\alpha$ -SMAは、原発腫瘍及び肝臓転移において、間質細胞のほとんど全てで発現した(図13)。浸潤深度及びUICCステージは間質性tNRG-1発現と有意に関連した( $P=.04$ 及び $P=.005$ ；傾向についてのカイ二乗検定)。更に、高い間質性tNRG-1発現は、5年PFSの減少に有意に関連した( $P=.002$ ；カイ二乗検定)(図8B)。

40

## 【 0 0 6 5 】

50

データをさらに確認するため、CRC組織及び近傍正常結腸直腸組織の追加の3組を集めた。腫瘍及び近傍正常組織に関係する間葉細胞(それぞれT-MC及びN-MC)を単離した。T-MCはBM-MSCに形態学的に類似していた(図9A)。T-MCのフローサイトメトリにより、BM-MSCに特徴的な抗原の類似する発現パターンが明らかになった(図9B)(61)。T-MCでは骨形成分化が顕著に誘導可能であるが脂肪形成分化も限定的に誘導可能であった(図9C)。このことは、T-MCが多能性の形質を維持することを示唆する。これら培養間葉細胞のウェスタンブロット分析により、3つ全ての腫瘍培養物及び3つの正常培養物の1つでtNRG-1発現が明らかになった(図8C)。一致することに、tNRG-1発現レベルが最も強い第1の患者から得たT-MCのCMは、N-MCのCMと比較して、HCT-8/E11細胞でのHER3及びAKT活性化の誘導がより強力であった(図8D)。加えて、腫瘍組織及び近傍正常組織から間質液を集め(44)、腫瘍間質液が培養HCT-8/E11 CRC細胞でHER3/AKTを活性化できることを見出した(図8E)。このことは、細胞外空間への機能的に活性なNRG-1の放出を示唆する。次に、CMT-MC誘導HER3活性化が、HCT-8/E11浸潤及び細胞数の刺激において機能的役割を演じるかどうかを調べた。CM<sup>T-MC</sup>に曝露したとき、HCT-8/E11の浸潤指数がコントロールと比較して5倍増加することが見い出された( $P < .001$ 、カイ二乗検定)。ペルツズマブでの処理は、CM<sup>T-MC</sup>増強浸潤を部分的に阻害した( $P = .02$ 、カイ二乗検定)一方で、セツキシマブはこの効果を模倣できなかった(図8F)。加えて、CM<sup>T-MC</sup>で処理したHCT-8/E11細胞の増殖は有意に増大した( $P < .001$ 、反復測定二元配置ANOVA検定)。この栄養性効果はペルツズマブによりブロックされた( $P = .014$ 、反復測定二元配置ANOVA検定)(図8G)。

10

20

【 0 0 6 6 】

表2. CRC患者における臨床病理学的特徴及び5年PFFSとのtNRG-1の関係

年齢	性別	位置	TNM	UICCステージ	5年PFFS	増悪の原因	tNRG-1 IHCスコア
1	M	S状結腸	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	I	ⅠEス		低
2	M	下行結腸	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	I	ⅠEス		低
3	M	S状結腸	T <sub>3</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>	III	ⅠEス		低
4	F	S状結腸	T <sub>3</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>	III	不明		低
5	F	直腸	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	II	ⅠEス		低
6	F	下行結腸	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	I	ⅠEス		低
7	F	S状結腸	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	II	ⅠEス		低
8	M	S状結腸	T <sub>4</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	III	ノ	局所再発	低
9	F	右半結腸	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	I	ⅠEス		低
10	F	上行結腸	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	III	ノ	脳転移	低
11	M	S状結腸	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	II	ⅠEス		低

10

20

30

40

【表 2 - 2】

12	66	E	直腸	I <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	I	不明	低
13	80	F	S状結腸	I <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	I	不明	低
14	86	M	横行結腸	I <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	I	不明	高
15	81	M	直腸	I <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	III	ノ	高
16	76	M	直腸	I <sub>4</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>	III	ノ	高
17	72	M	直腸	I <sub>x</sub> N <sub>x</sub> M <sub>1</sub>	IV	ノ	高
18	65	F	直腸	I <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	II	イエス	高
19	73	M	S状結腸	I <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	II	イエス	高
20	88	M	下部直腸	I <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	II	イエス	高
21	54	F	右半結腸	I <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	II	不明	高
22	80	F	直腸	I <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	II	不明	高
23	94	F	上行結腸	I <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	II	不明	高
24	79	M	下部直腸	I <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	I	不明	高
25	74	F	直腸	I <sub>3</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>	III	イエス	高
26	82	M	横行結腸	I <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	I	不明	高
27	79	M	S状結腸	I <sub>3</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>	III	不明	高

肺及び心骨転移  
 腹膜転移  
 転移性疾患

10

20

30

40

【表 2 - 3】

28	54	M	直腸	$I_4N_2M_0$	Ⅲ	ノ二	骨転移	高
29	73	F	S状結腸	$I_2N_0M_0$	I	不明		高
30	69	M	直腸	$I_3N_1M_0$	Ⅲ	不明		高
31	85	F	S状結腸	$I_3N_0M_0$	Ⅱ	不明		高
32	65	F	右半結腸	$I_4N_0M_0$	Ⅱ	ノ二	局所再発	高
33	65	F	回腸	$I_4N_2M_0$	Ⅲ	不明		高
34	69	F	左半結腸	$I_2N_2M_1$	Ⅳ	ノ二	転移性疾患	高
35	86	M	右半結腸	$I_3N_0M_0$	Ⅱ	不明		高
36	71	M	肝曲(hepatic corner)	$I_3N_0M_0$	Ⅱ	イエス		高
37	66	M	S状結腸	$I_4N_1M_0$	Ⅲ	不明		高
38	75	M	横行結腸	$I_4N_1M_0$	Ⅲ	ノ二	小腸再発	高
39	55	F	左半結腸	$I_2N_2M_1$	Ⅳ	ノ二	転移性疾患	高
40	72	F	S状結腸	$I_2N_1M_0$	Ⅲ	ノ二	肝臓転移	高
41	80	M	左半結腸	$I_3N_1M_0$	Ⅲ	ノ二	肝臓転移	高
42	53	F	左半結腸	$I_4N_1M_0$	Ⅲ	ノ二	肺転移	高
43	69	F	S状結腸	$I_2N_2M_1$	Ⅳ	ノ二	転移性疾患	高

10

20

30

40

【表 2 - 4】

44	74	M	肝曲(hepatic corner)	$I_xN_xM_1$	IV	ノ二	転移性疾患	高
45	61	M	直腸	$I_xN_xM_1$	IV	ノ二	転移性疾患	高
46	85	F	下部直腸	$I_3N_2M_0$	III	ノ二	局所再発及び肺転移	高
47	75	M	下部直腸	$I_3N_0M_0$	II	ノ二	局所再発	高
48	67	F	S状結腸	$I_3N_2M_0$	III	ノ二	肝臓転移	高
49	43	F	不明	$I_xN_xM_1$	IV	ノ二	転移性疾患	高
50	41	M	右半結腸	$I_3N_2M_0$	III	ノ二	局所再発	高
51	70	M	不明	$I_xN_xM_1$	IV	ノ二	転移性疾患	高
52	64	F	S状結腸	$I_3N_0M_0$	II	ノ二	肝臓及び肺転移	高
53	69	F	S状結腸	$I_3N_1M_0$	III	ノ二	肺及び骨転移	高
54	82	F	直腸	$I_3N_1M_0$	III	イエス		高

10

20

30

40

【 0 0 6 7 】

参考文献

1. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of

50

- eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(4):212-236.
2. De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol.* 2003;200(4):429-447.
3. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 2007;213(2):341-347.
4. Menon LG, Picinich S, Koneru R, Gao H, Lin SY, Koneru M, et al. Differential Gene Expression Associated with Migration of Mesenchymal Stem Cells to Conditioned Medium from Tumor Cells or Bone Marrow Cells. *Stem Cells.* 2007;25(2):520-528.
5. Hung S-C, Deng W-P, Yang WK, Liu R-S, Lee C-C, Su T-C, et al. Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging. *Clin Cancer Res.* 2005;11(21):7749-7756. 10
6. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.* 2007;449(7162):557-563.
- 【 0 0 6 8 】
7. Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, et al. Mesenchymal stem cells: Potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(21):1593-1603. 20
8. De Boeck A, Narine K, De Neve W, Mareel M, Bracke M, De Wever O. Resident and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2010;46(5):336-342.
9. De Wever O, Nguyen QD, Van Hoorde L, Bracke M, Bruyneel E, Gespach C, et al. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J.* 2004;18(9):1016-1018.
10. De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer.* 2008;123(10):2229-2238. 30
11. Haddow A, George Klein SW, Alexander H. Molecular Repair, Wound Healing, And Carcinogenesis: Tumor Production A Possible Overhealing? In: *Adv Cancer Res: Academic Press;* 1973:181-234.
12. Flier JS, Underhill LH, Dvorak HF. Tumors: Wounds That Do Not Heal. *N Engl J Med.* 1986;315(26):1650-1659.
- 【 0 0 6 9 】
13. Mayer A, Takimoto M, Fritz E, Schellander G, Kofler K, Ludwig H. The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdr gene expression in colorectal cancer. *Cancer.* 1993;71(8):2454-2460. 40
14. Hemming AW, Davis NL, Klufftinger A, Robinson B, Quenville NF, Liseman B, et al. Prognostic markers of colorectal cancer: an evaluation of DNA content, epidermal growth factor receptor, and Ki-67. *J Surg Oncol.* 1992;51(3):147-152.
15. Grivas PD, Antonacopoulou A, Tzelepi V, Sotiropoulou-Bonikou G, Kefalopoulou Z, Papavassiliou AG, et al. HER-3 in colorectal tumorigenesis: from mRNA levels through protein status to clinicopathologic relationships. *Eur J Cancer.* 2007;43(17):2602-2611.
16. Kapitanovic S, Radosevic S, Slade N, Kapitanovic M, Andelinovic S, Ferencic Z, et al. Expression of erbB-3 protein in colorectal adenocarcinoma: correlation with poor survival. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2000;126(4):205-211. 50

17. Ho-Pun-Cheung A, Assenat E, Bascoul-Mollevis C, Bibeau F, Boissiere-Michot F, Cellier D, et al. EGFR and HER3 mRNA expression levels predict distant metastases in locally advanced rectal cancer. *Int J Cancer*. 2011;128(12):2938-2946.
18. Jones JT, Akita RW, Sliwkowski MX. Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett*. 1999;447(2-3):227-231.

【 0 0 7 0 】

19. Carraway KL, 3rd, Weber JL, Unger MJ, Ledesma J, Yu N, Gassmann M, et al. Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature*. 1997;387(6632):512-516.
20. Crovello CS, Lai C, Cantley LC, Carraway KL, 3rd. Differential signaling by the epidermal growth factor-like growth factors neuregulin-1 and neuregulin-2. *J Biol Chem*. 1998;273(41):26954-26961. 10
21. Massague J, Pandiella A. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem*. 1993;62:515-541.
22. Montero JC, Yuste L, Diaz-Rodriguez E, Esparis-Ogando A, Pandiella A. Differential shedding of transmembrane neuregulin isoforms by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Mol Cell Neurosci*. 2000;16(5):631-648.
23. Stove C, Boterberg T, Van Marck V, Mareel M, Bracke M. Bowes melanoma cells secrete heregulin, which can promote aggregation and counteract invasion of human mammary cancer cells. *Int J Cancer*. 2005;114(4):572-578. 20
24. Sheng Q, Liu X, Fleming E, Yuan K, Piao H, Chen J, et al. An Activated ErbB3/NRG1 Autocrine Loop Supports In Vivo Proliferation in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Cell*. 2010;17(3):298-310.

【 0 0 7 1 】

25. Noguchi H, Sakamoto C, Wada K, Akamatsu T, Uchida T, Tatsuguchi A, et al. Expression of heregulin alpha, erbB2, and erbB3 and their influences on proliferation of gastric epithelial cells. *Gastroenterology*. 1999;117(5):1119-1127.
26. de Alava E, Ocana A, Abad M, Montero JC, Esparis-Ogando A, Rodriguez CA, et al. Neuregulin Expression Modulates Clinical Response to Trastuzumab in Patients With Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25(19):2656-2663. 30
27. Nagata K, Wada K, Tatsuguchi A, Futagami S, Gudis K, Miyake K, et al. Heregulin-alpha and heregulin-beta expression is linked to a COX-2-PGE2 pathway in human gastric fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(6):G1243-1251.
28. Eschrich S, Yang I, Bloom G, Kwong KY, Boulware D, Cantor A, et al. Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol*. 2005;23(15):3526-3535.
29. Yoshioka T, Nishikawa Y, Ito R, Kawamata M, Doi Y, Yamamoto Y, et al. Significance of integrin alphavbeta5 and erbB3 in enhanced cell migration and liver metastasis of colon carcinomas stimulated by hepatocyte-derived heregulin. *Cancer Sci*. 2010;101(9):2011-2018. 40
30. Liles JS, Arnoletti JP, Kossenkov AV, Mikhaylina A, Frost AR, Kulesza P, et al. Targeting ErbB3-mediated stromal-epithelial interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 105(4):523-533.

【 0 0 7 2 】

31. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(23):2335-2342.
32. Van Cutsem E, Kohne C-H, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien C-R, Makhson A, et al. Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Ca 50

ncer. *New England Journal of Medicine*. 2009;360(14):1408-1417.

33. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion: Testing for KRAS Gene Mutations in Patients With Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(12):2091-2096.

34. Franklin MC, Carey KD, Vajdos FF, Leahy DJ, de Vos AM, Sliwkowski MX. Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell*. 2004;5(4):317-328.

35. Agus DB, Akita RW, Fox WD, Lewis GD, Higgins B, Pisacane PI, et al. Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell*. 2002;2(2):127-137.

36. <http://clinicaltrials.gov/>.

【 0 0 7 3 】

37. Stove C, Stove V, Derycke L, Van Marck V, Mareel M, Bracke M. The heregulin/human epidermal growth factor receptor as a new growth factor system in melanoma with multiple ways of deregulation. *J Invest Dermatol*. 2003;121(4):802-812.

38. Falls DL. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res*. 2003;284(1):14-30.

39. Wolpin BM, Mayer RJ. Systemic Treatment of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2008;134(5):1296-1310.e1291.

40. Koninckx R, Hensen K, Daniels A, Moreels M, Lambrichts I, Jongen H, et al. Human bone marrow stem cells co-cultured with neonatal rat cardiomyocytes display limited cardiomyogenic plasticity. *Cytotherapy*. 2009;11(6):778-792.

41. Vermeulen SJ, Bruyneel EA, Bracke ME, De Bruyne GK, Vennekens KM, Vleminckx KL, et al. Transition from the noninvasive to the invasive phenotype and loss of alpha-catenin in human colon cancer cells. *Cancer Res*. 1995;55(20):4722-4728.

42. Maynard DM, Heijnen HFG, Horne MK, White JG, Gahl WA. Proteomic analysis of platelet  $\alpha$ -granules using mass spectrometry. *J Thromb Haemost*. 2007;5(9):1945-1955.

【 0 0 7 4 】

43. Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 1999;20(18):3551-3567.

44. Celis JE, Gromov P, Cabezon T, Moreira JMA, Ambartsumian N, Sandelin K, et al. Proteomic Characterization of the Interstitial Fluid Perfusing the Breast Tumor Microenvironment. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3(4):327-344.

45. De Wever O, Hendrix A, De Boeck A, Westbroek W, Braems G, Emami S, et al. Modeling and quantification of cancer cell invasion through collagen type I matrices. *Int J Dev Biol*. 2009.

46. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997;91(2):231-241.

47. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;74(4):609-619.

48. Jones RB, Gordus A, Krall JA, MacBeath G. A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays. *Nature*. 2006;439(7073):168-174.

【 0 0 7 5 】

10

20

30

40

50

49. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(2):127-137.
50. Shi F, Telesco SE, Liu Y, Radhakrishnan R, Lemmon MA. ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(17):7692-7697.
51. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* 1997;16(7):1647-1655.
52. Badache A, Hynes NE. A new therapeutic antibody masks ErbB2 to its partners. *Cancer Cell.* 2004;5(4):299-301.
53. Xia W, Liu L-H, Ho P, Spector NL. Truncated ErbB2 receptor (p95ErbB2) is regulated by heregulin through heterodimer formation with ErbB3 yet remains sensitive to the dual EGFR//ErbB2 kinase inhibitor GW572016. *Oncogene.* 2004;23(3):646-653.
54. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene.* 2007;26(45):6469-6487.

10

【 0 0 7 6 】

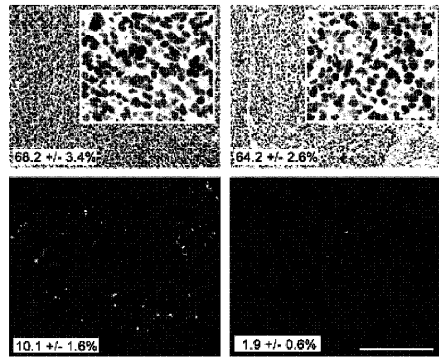
55. Cho H-S, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW, et al. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature.* 2003;421(6924):756-760.
56. Harding J, Burtneess B. Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chemotherapeutic human-murine monoclonal antibody. *Drugs Today (Barc).* 2005;41(2):107-127.
57. Stove C, Bracke M. Roles for neuregulins in human cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2004;21(8):665-684.
58. Frenzel KE, Falls DL. Neuregulin-1 proteins in rat brain and transfected cells are localized to lipid rafts. *J Neurochem.* 2001;77(1):1-12.
59. Burgess TL, Ross SL, Qian Y-x, Brankow D, Hu S. Biosynthetic Processing of neu Differentiation Factor. *J Biol Chem.* 1995;270(32):19188-19196.
60. Lu HS, Hara S, Wong LW-I, Jones MD, Katta V, Trail G, et al. Post-translational Processing of Membrane-associated neu Differentiation Factor Proisoforms Expressed in Mammalian Cells. *J Biol Chem.* 1995;270(9):4775-4783.
61. Dominici M, Blanc KL, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315 - 317.

20

30

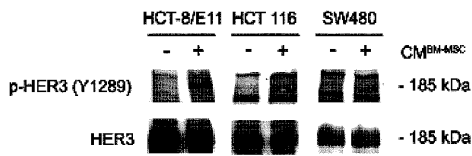
【 図 2 G 】

Figure 2 G



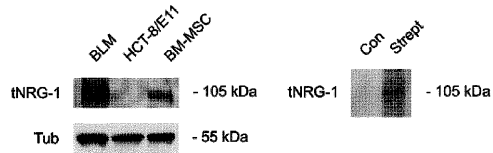
【 図 3 C 】

Figure 3 C



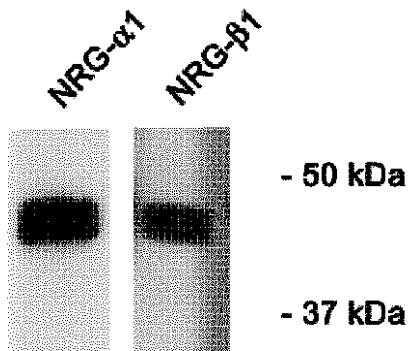
【 図 4 B 】

Figure 4 B



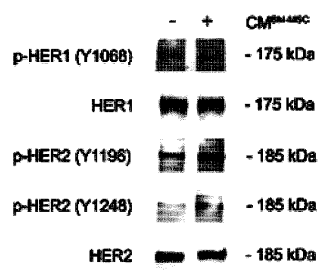
【 図 4 E 】

Figure 4 E



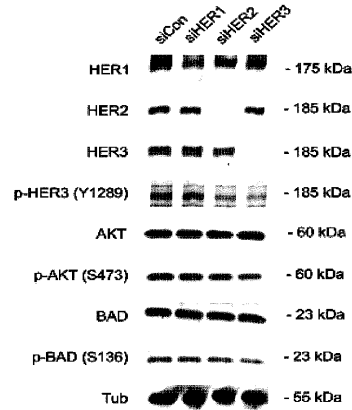
【 図 3 D 】

Figure 3 D



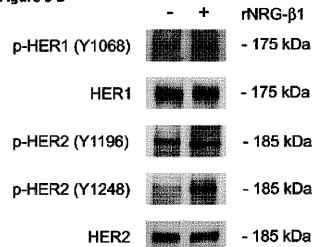
【 図 3 E 】

Figure 3 E



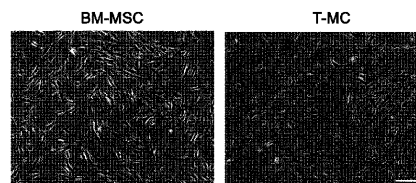
【 図 5 B 】

Figure 5 B



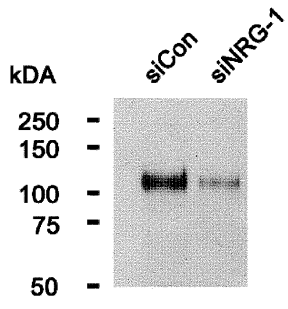
【 図 9 A 】

Figure 9 A

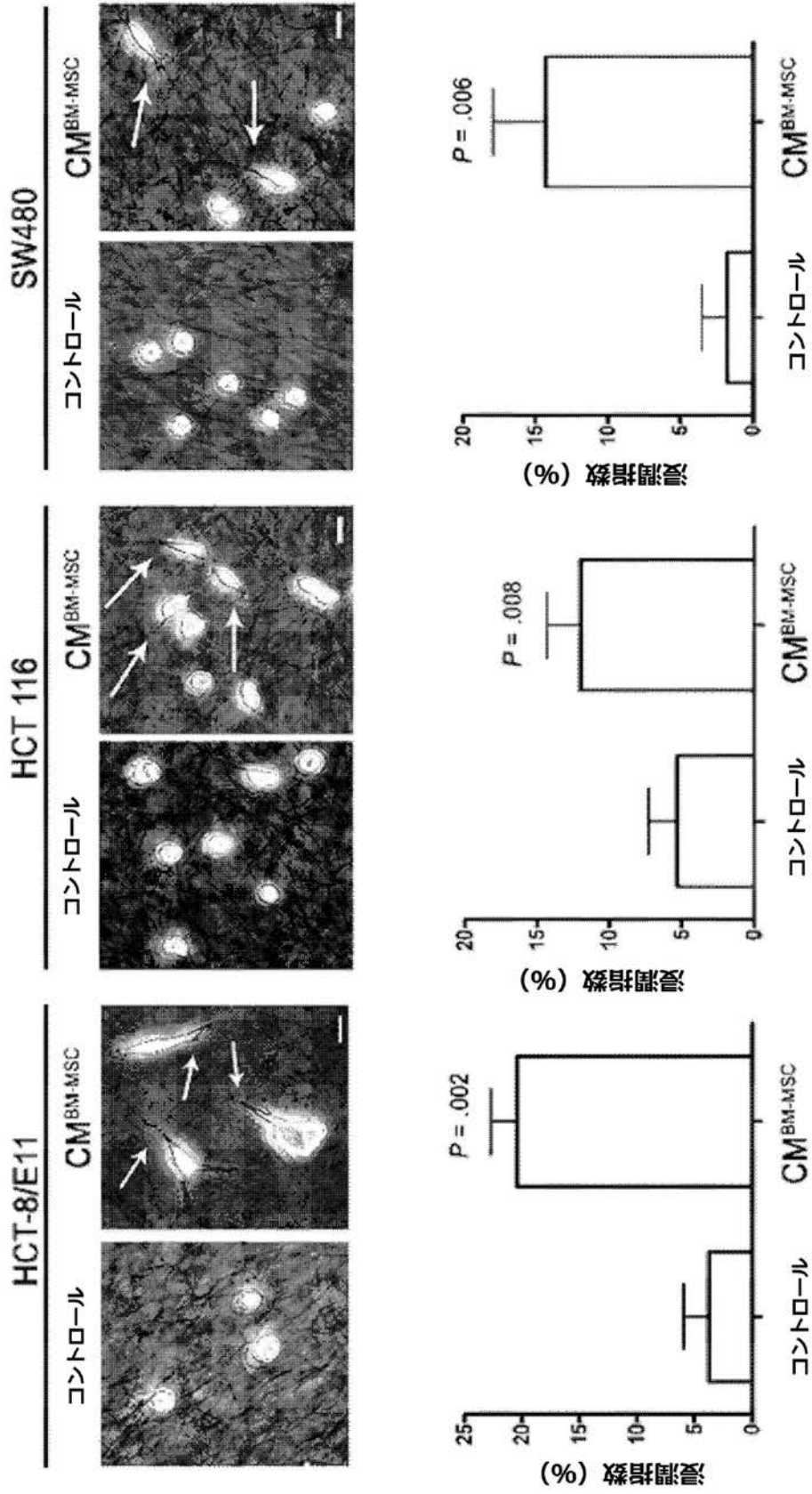


【 図 1 2 】

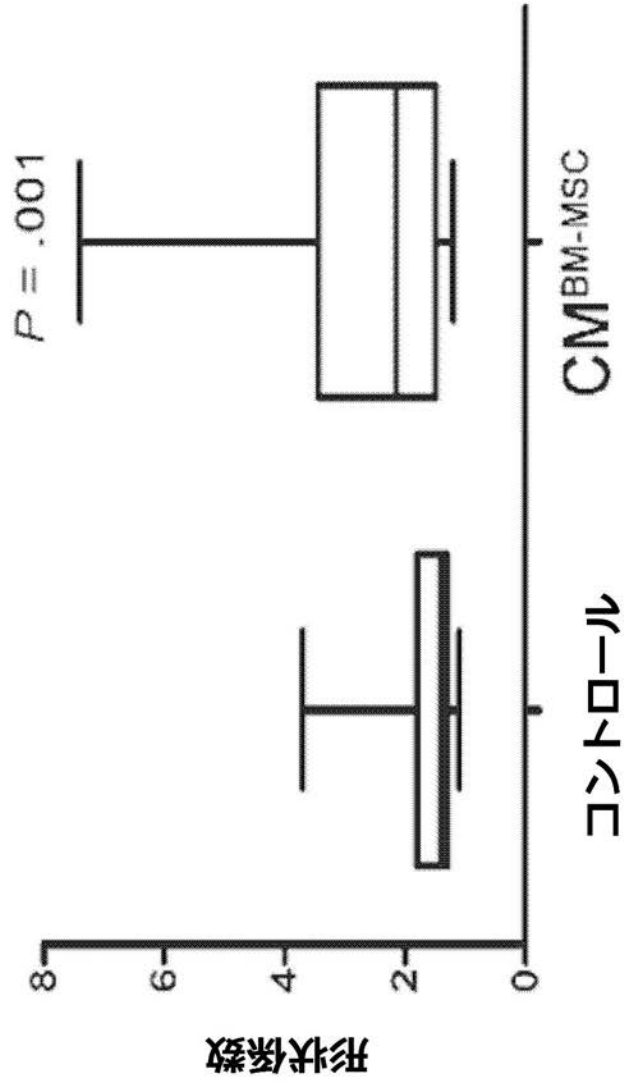
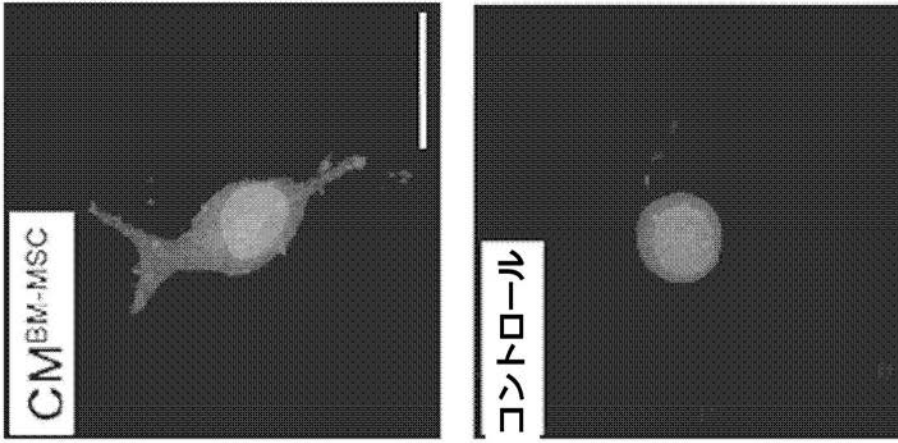
Figure 12



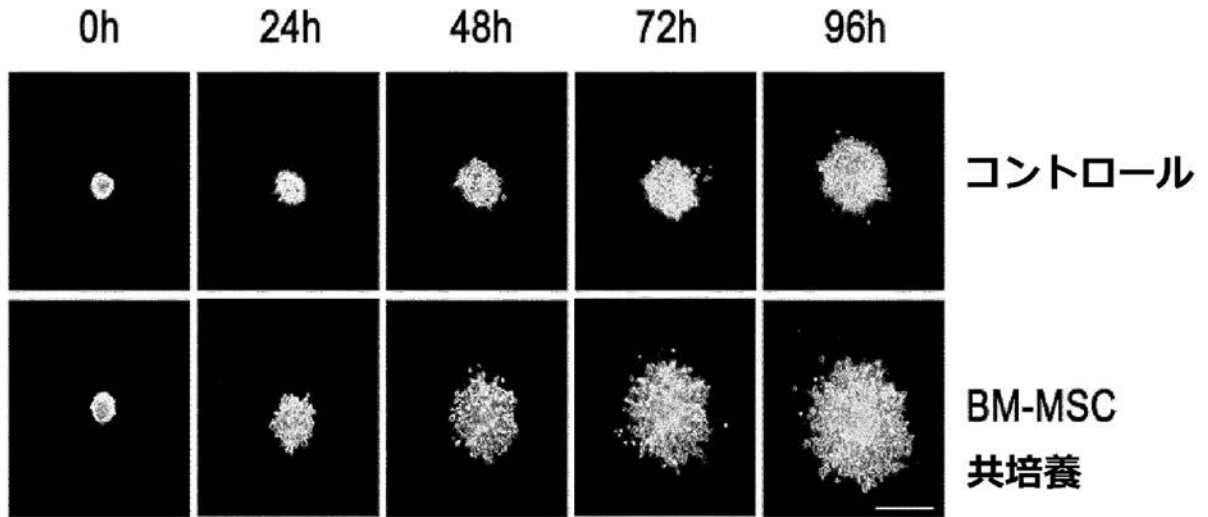
【 図 1 A 】



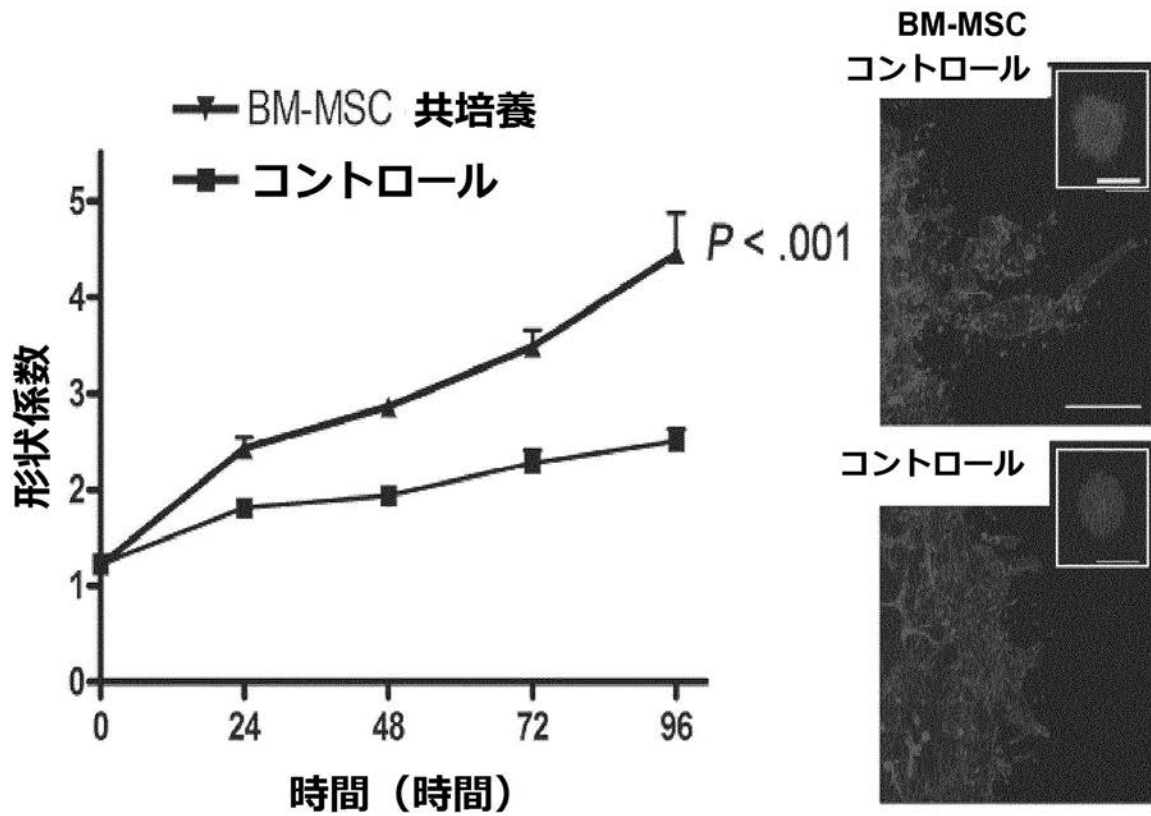
【 図 1 B 】



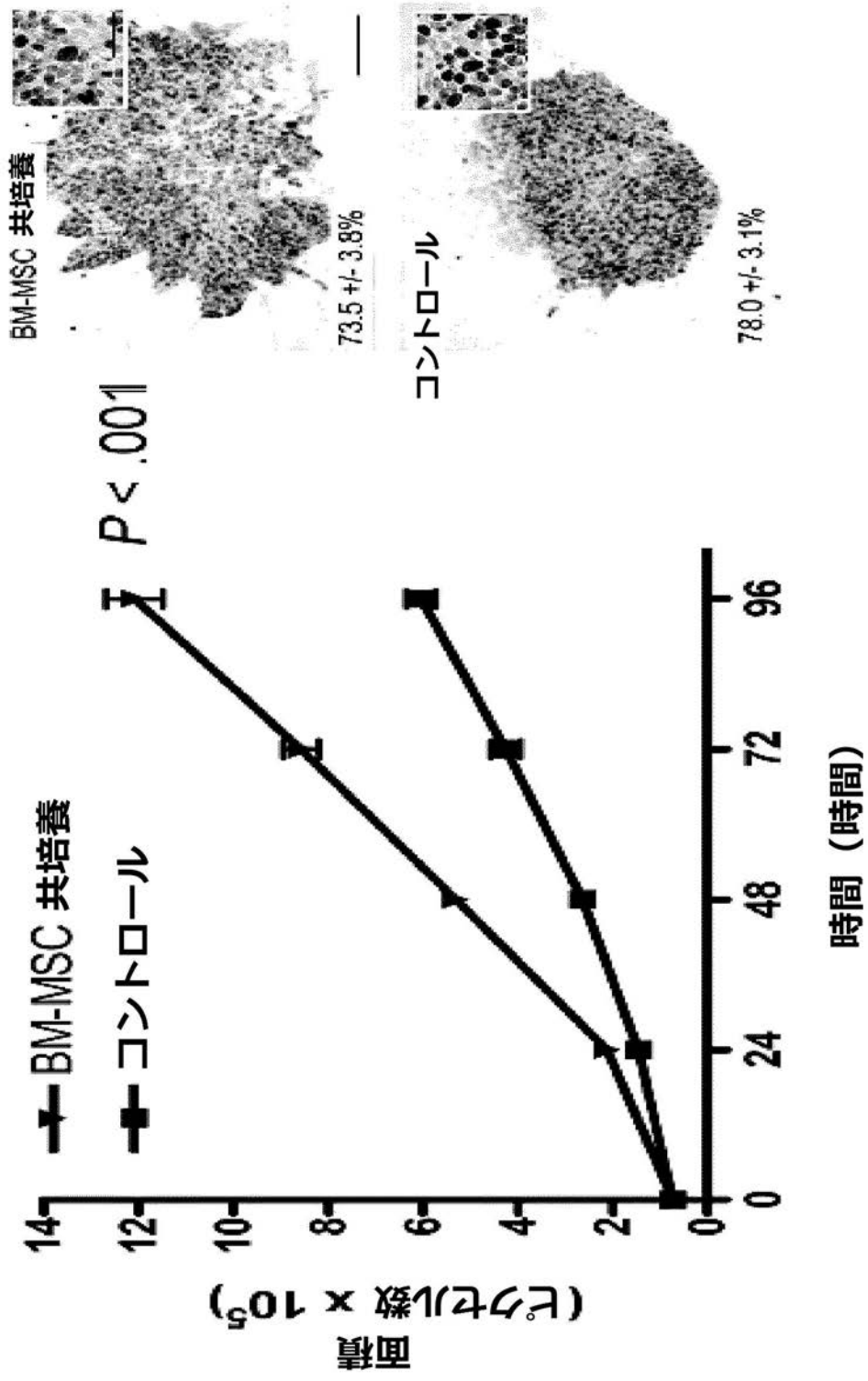
【図 1 C】



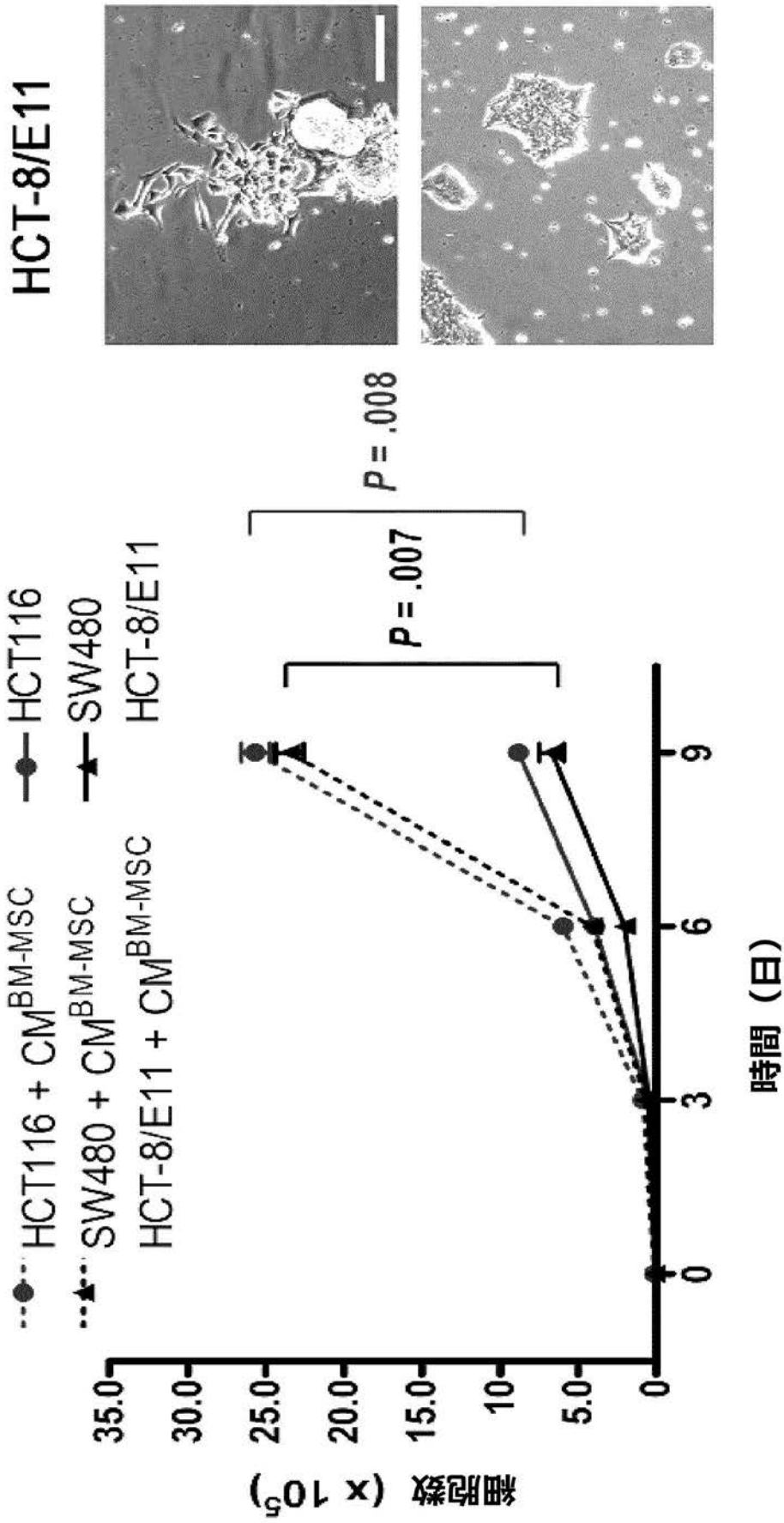
【図 1 D】



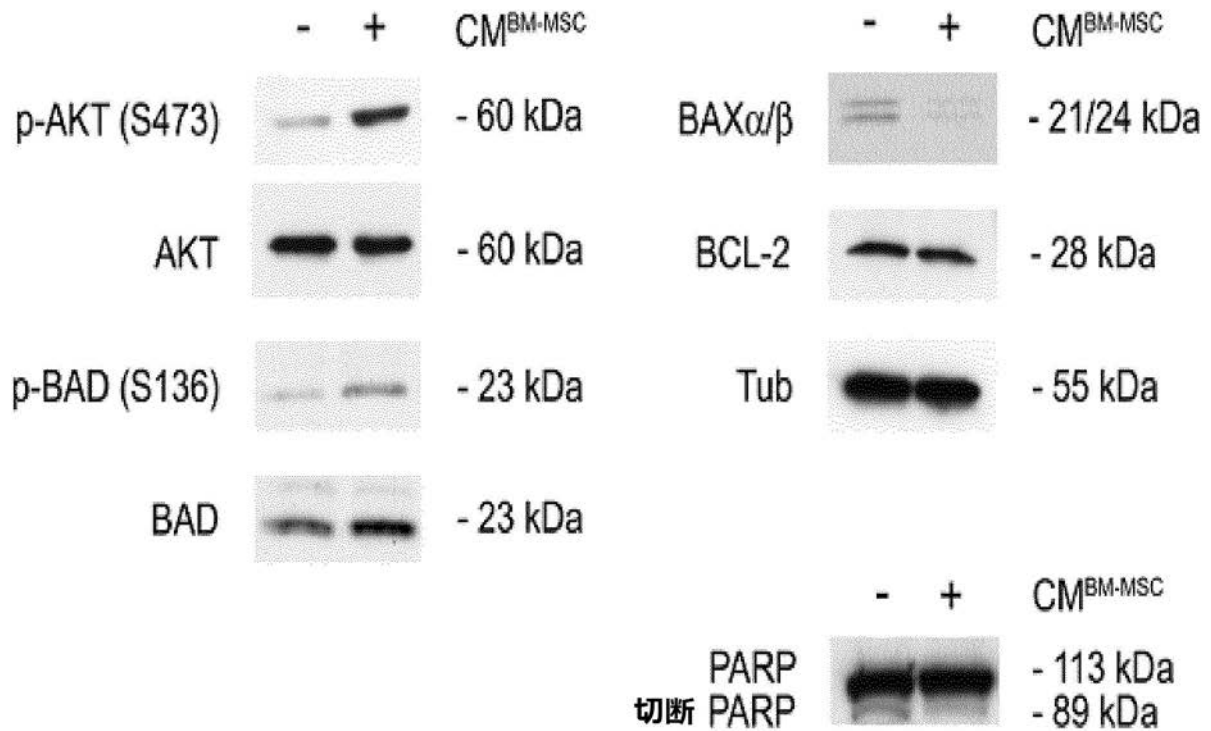
【 図 1 E 】



【 図 2 A 】



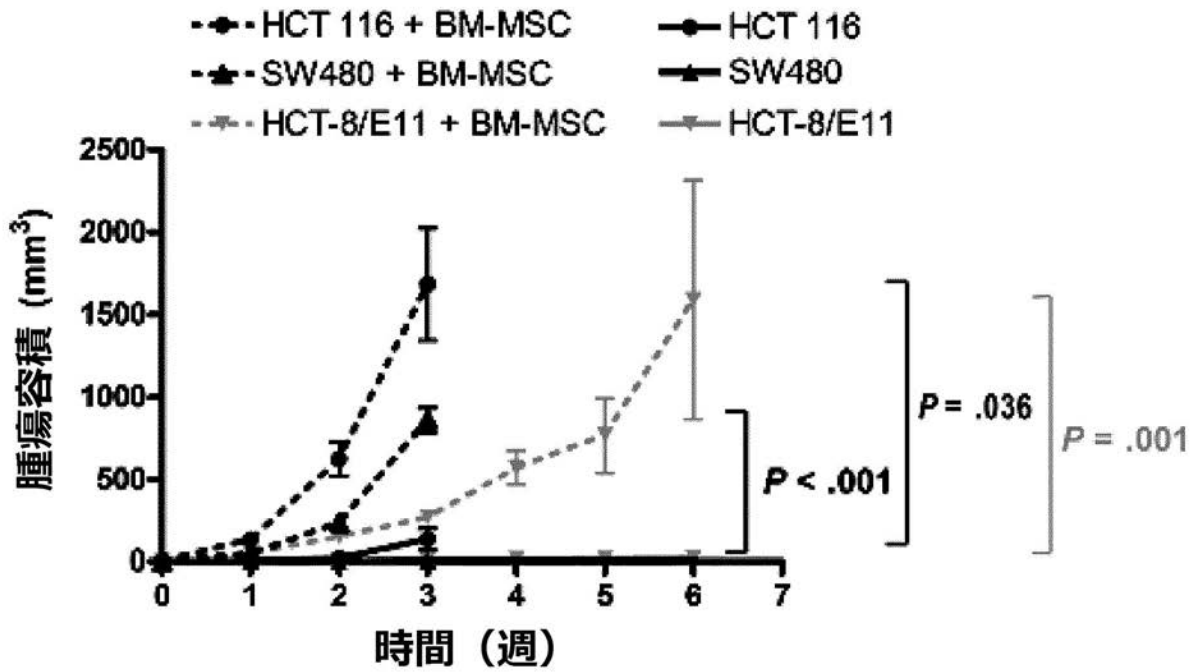
【 図 2 B 】



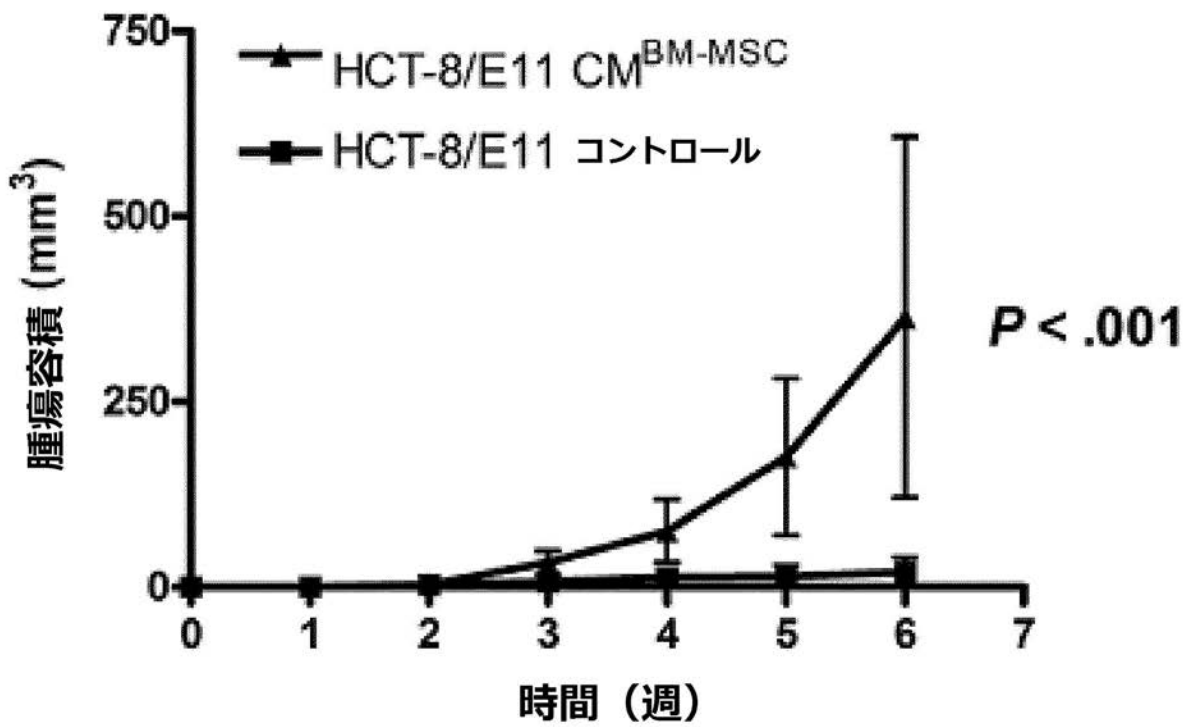
【 図 2 C 】

条件	接種した動物	腫瘍を示す動物	腫瘍獲得率 (%)
HCT-8/E11	10	2	20
HCT-8/E11 + BM-MSC	10	10	100
HCT-8/E11 CM <sup>BM-MSC</sup>	10	6	60
HCT116	10	10	100
HCT 116 + BM-MSC	10	10	100
SW480	10	2	20
SW480 + BM-MSC	10	10	100
BM-MSC	10	0	0

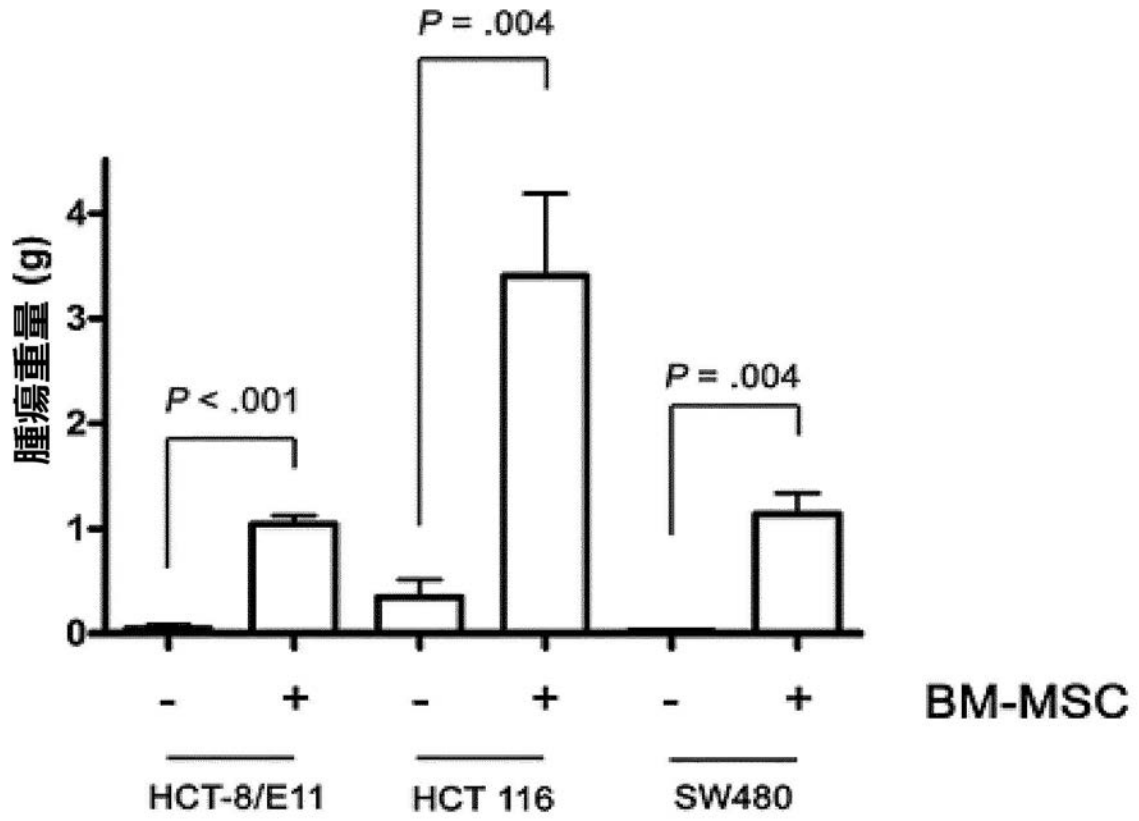
【 図 2 D 】



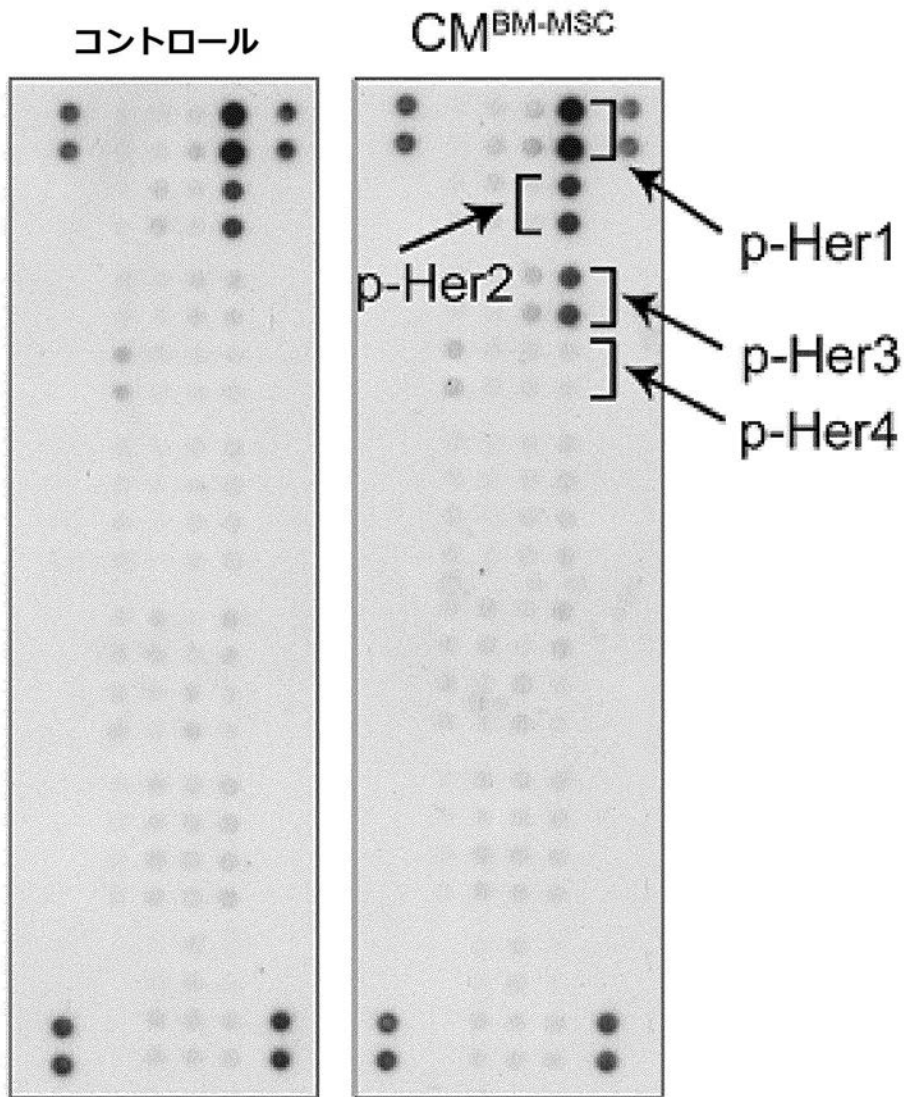
【 図 2 E 】



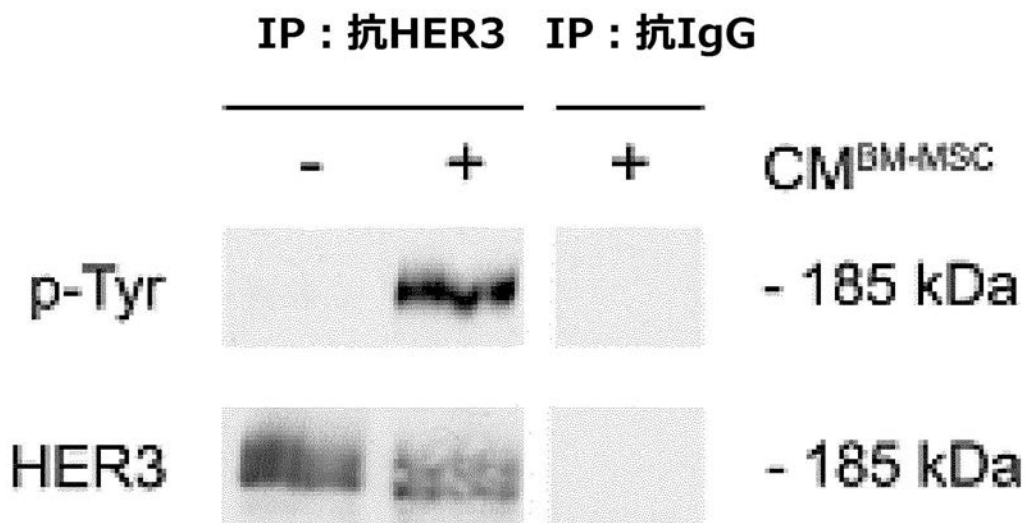
【 図 2 F 】



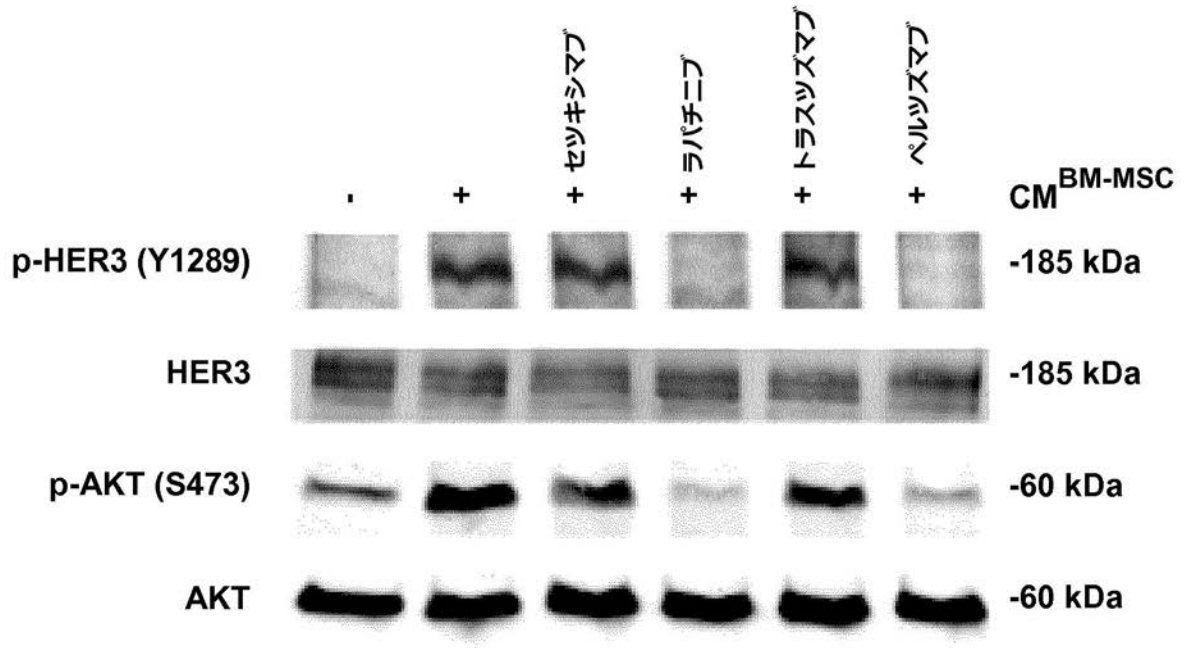
【図3A】



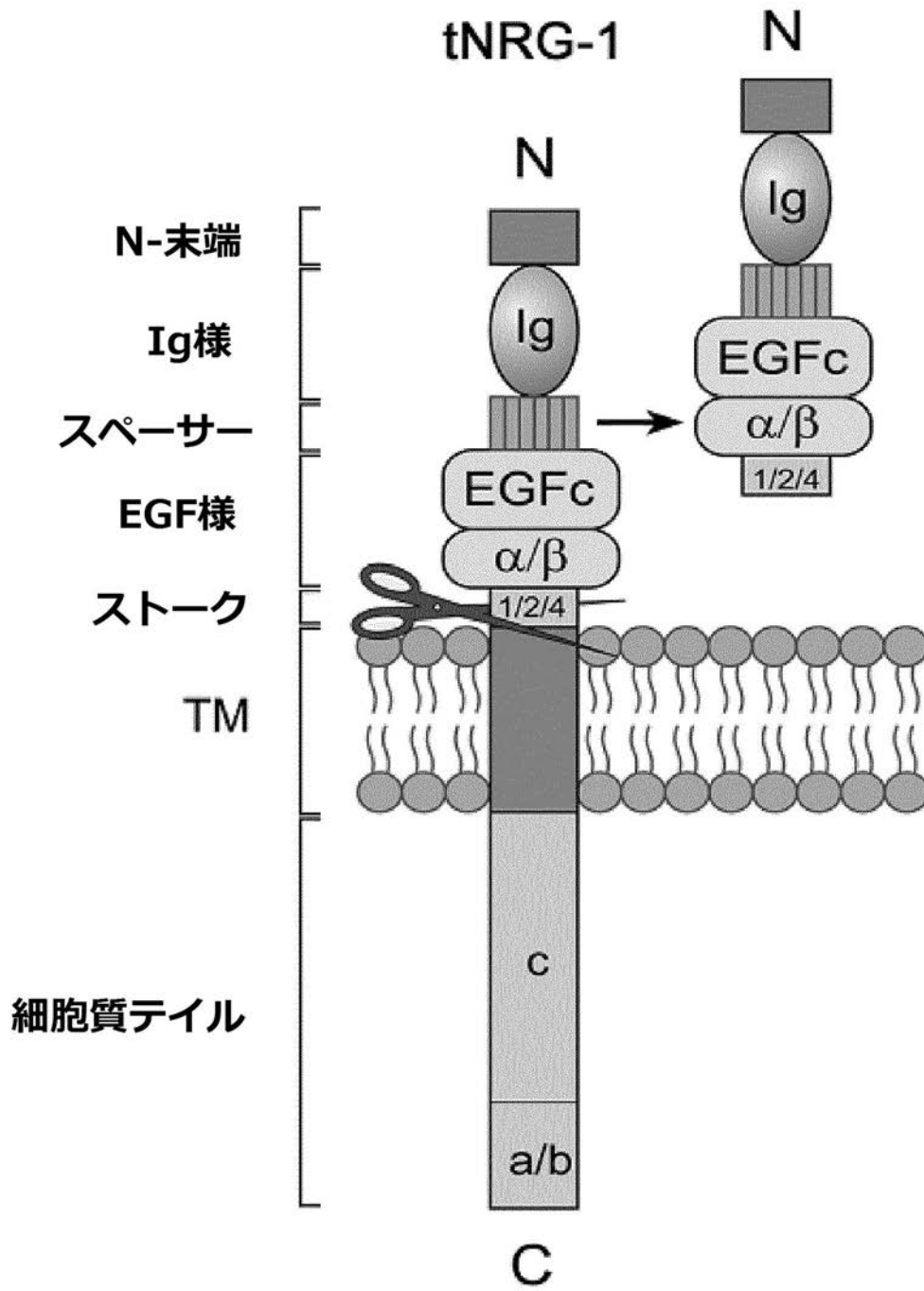
【図3B】



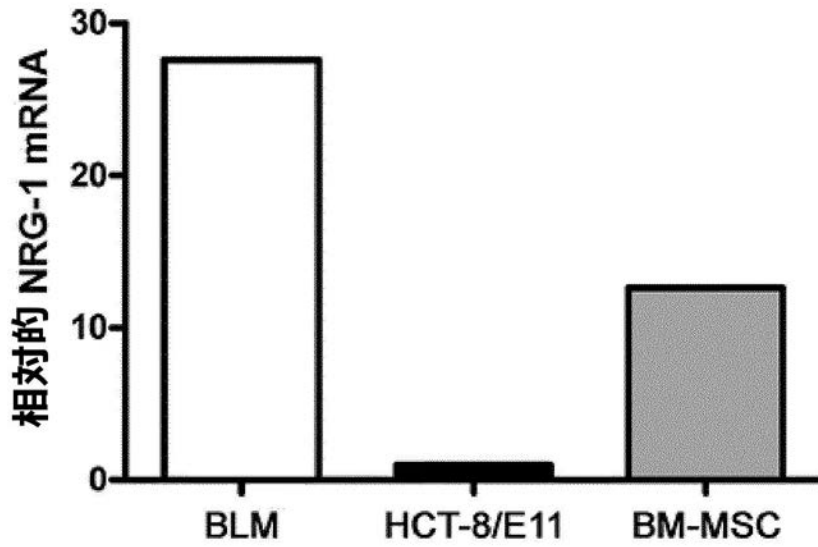
【 図 3 F 】



【 図 4 A 】



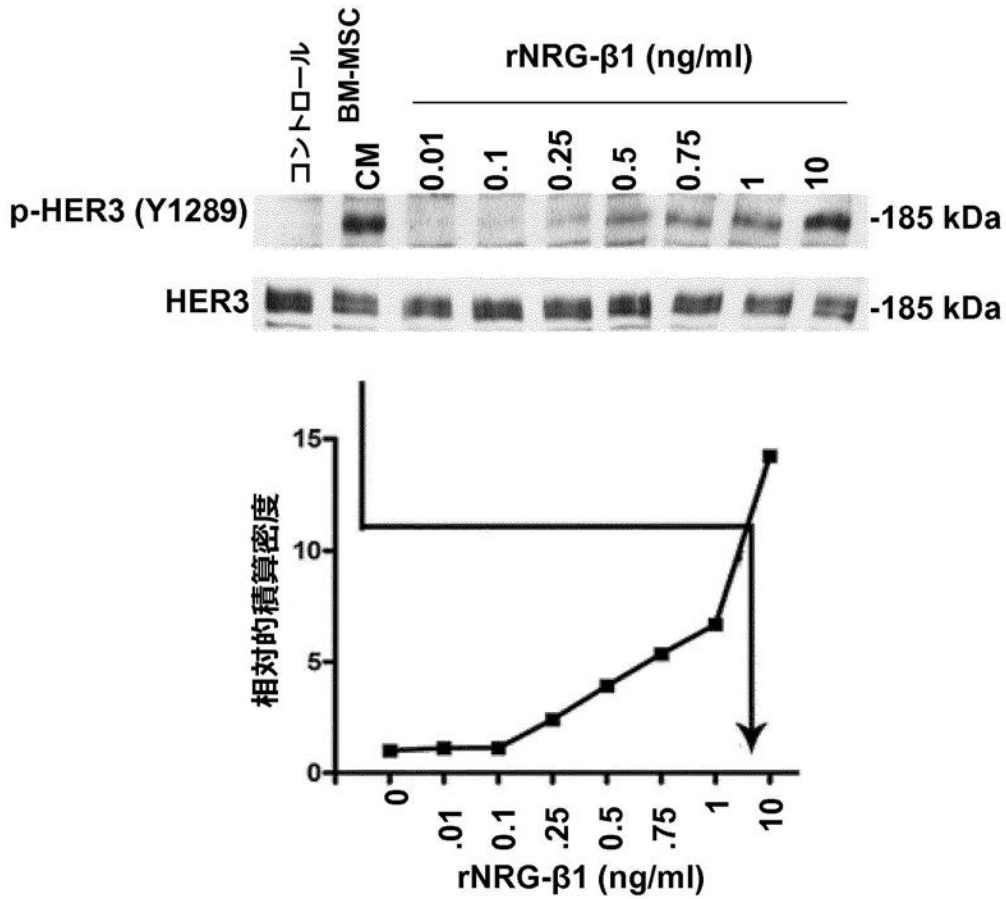
【 図 4 C 】



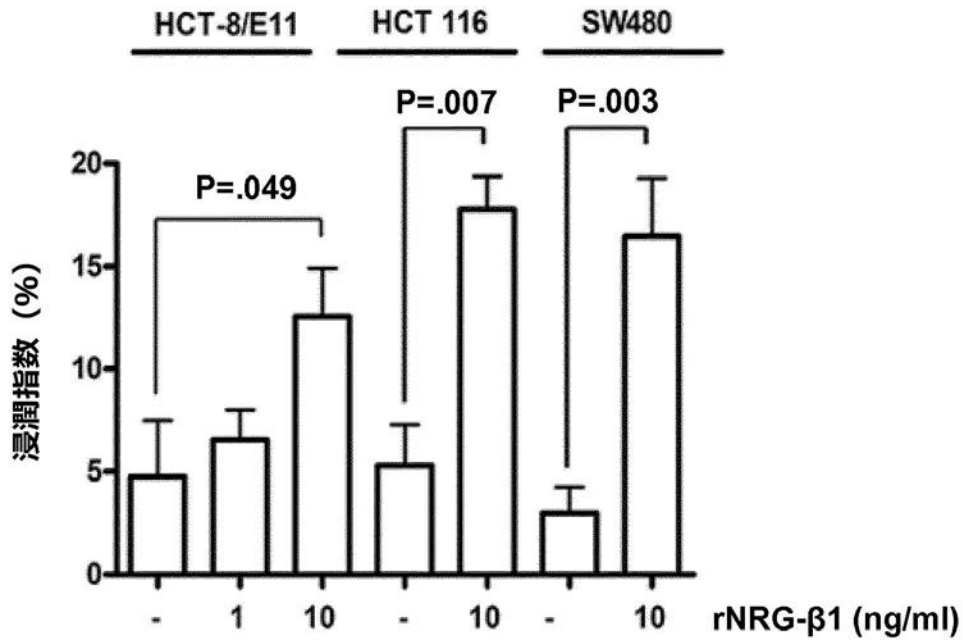
【 図 4 D 】

ペプチド	ヒットした ペプチド (exp1)	ヒットした ペプチド (exp2)	ドメイン
ASLADSGEYMCK	3	2	Ig様
CETSSEYSSLR	3	4	Ig様
LVLRCEYSSEYSSLR	/	1	Ig様
TFCVNGGECFMVK	3	1	EGFc

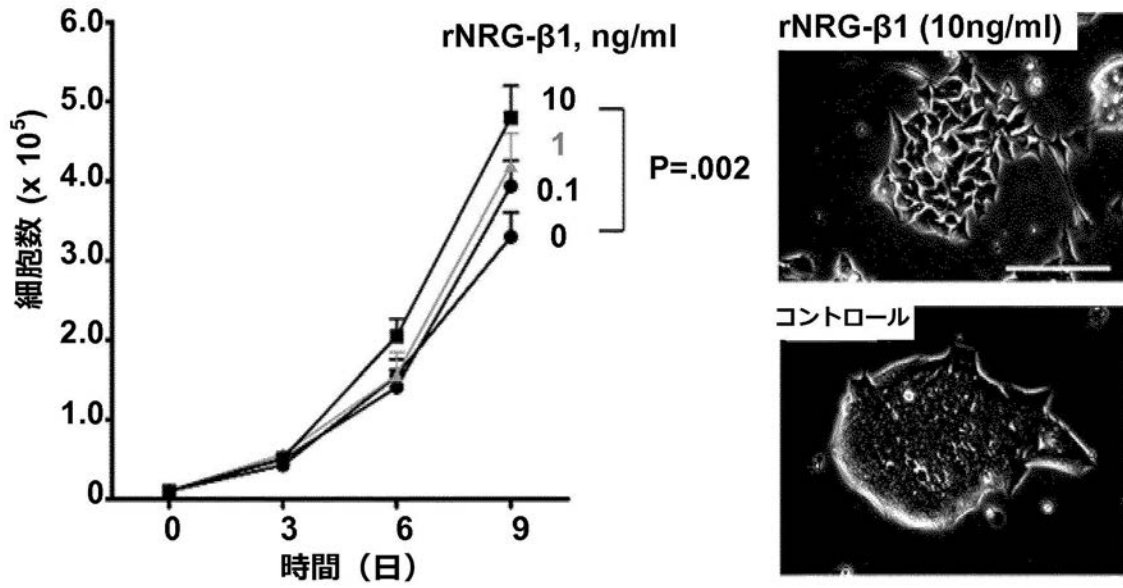
【 図 5 A 】



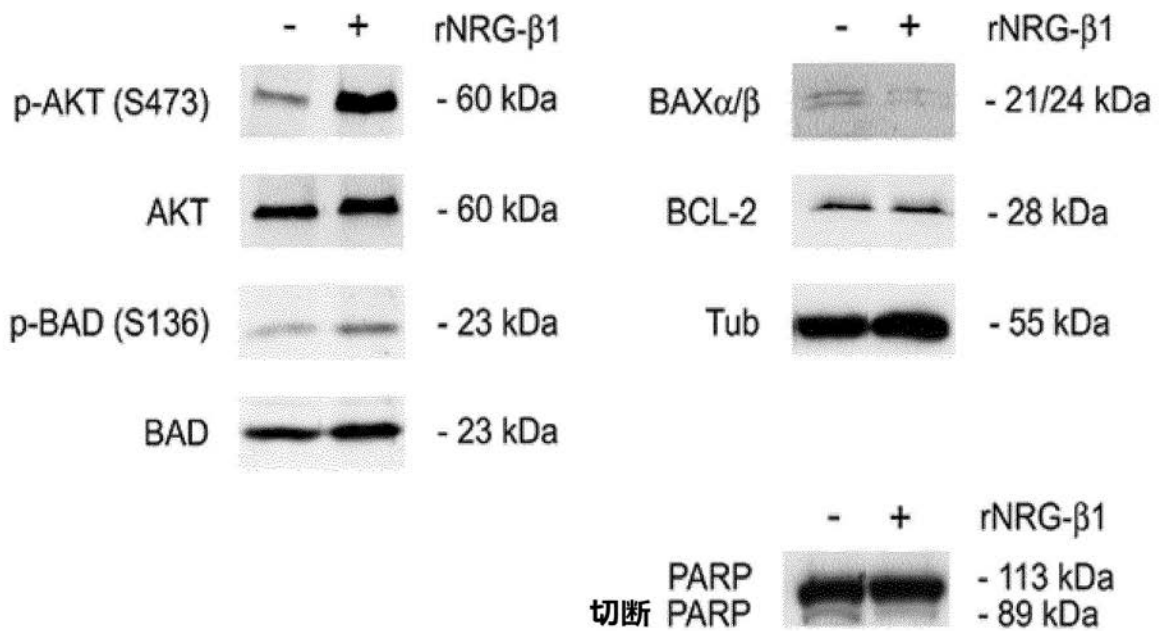
【 図 5 C 】



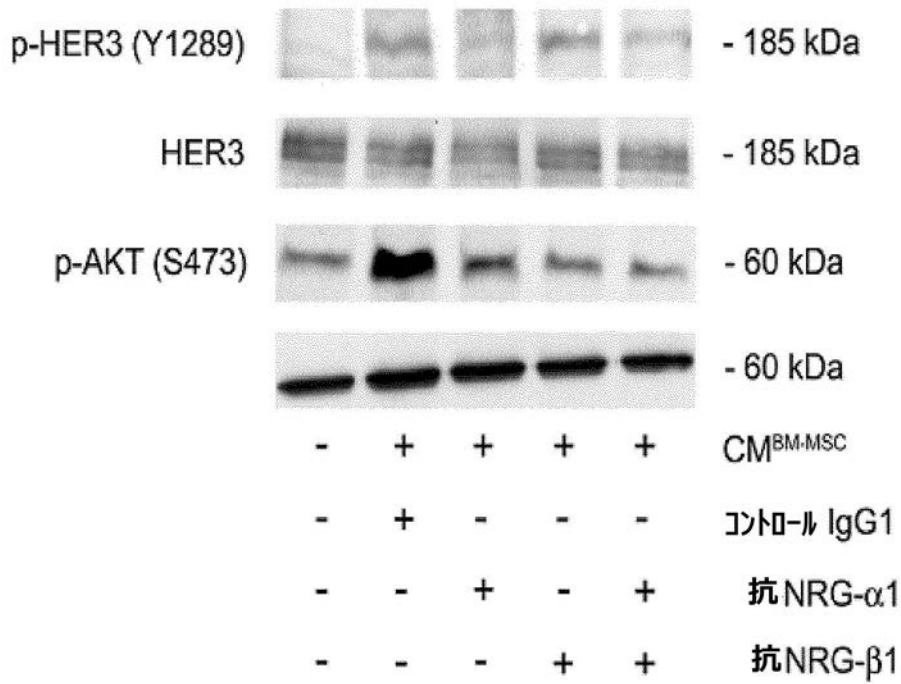
【 図 5 D 】



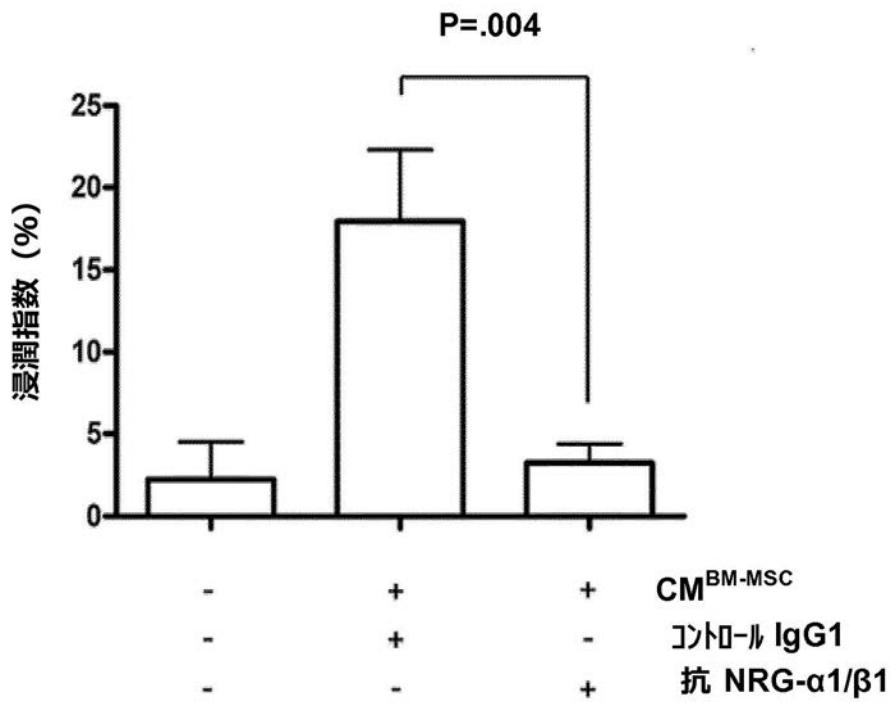
【 図 5 E 】



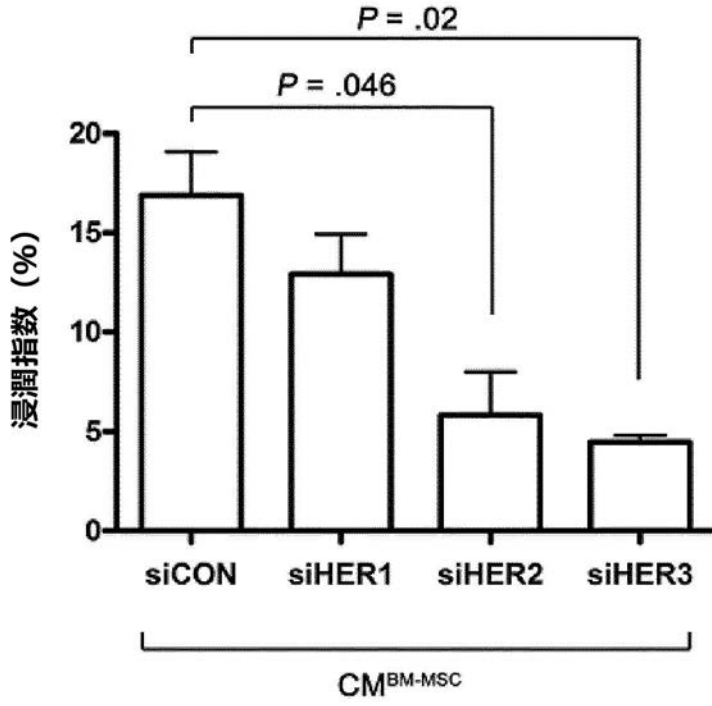
【 図 5 F 】



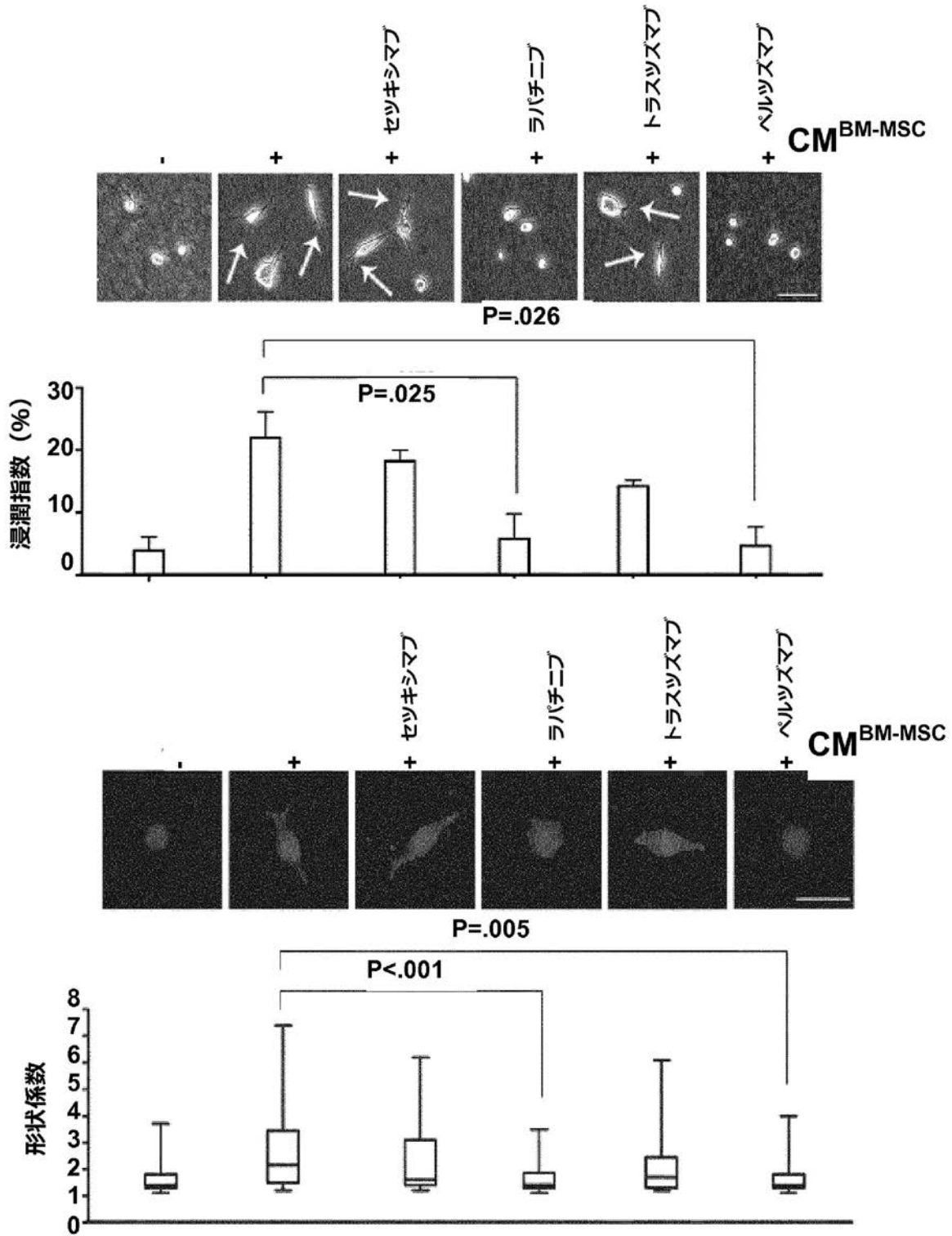
【 図 6 A 】



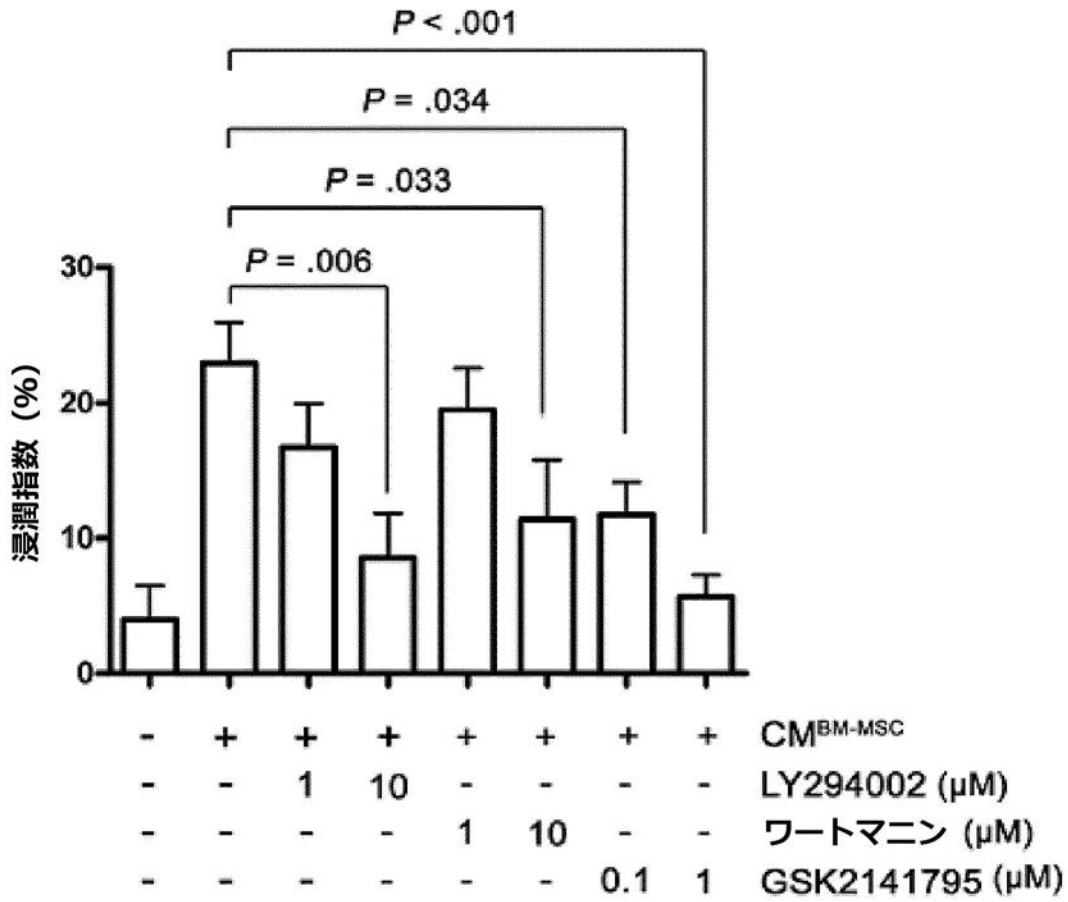
【 図 6 B 】



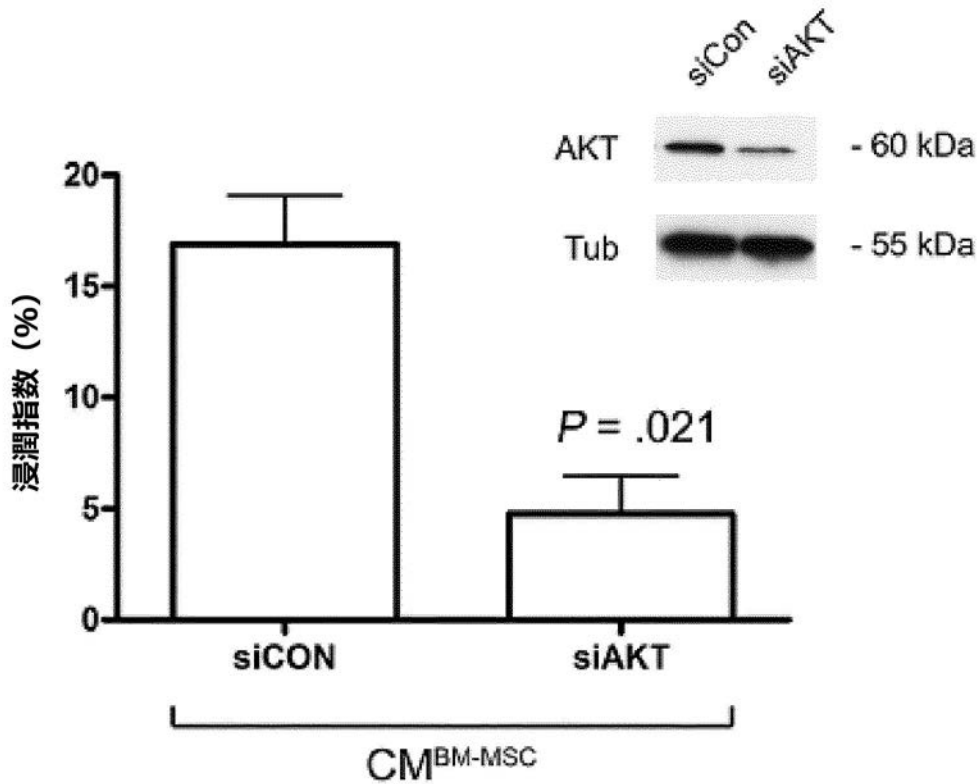
【 図 6 C 】



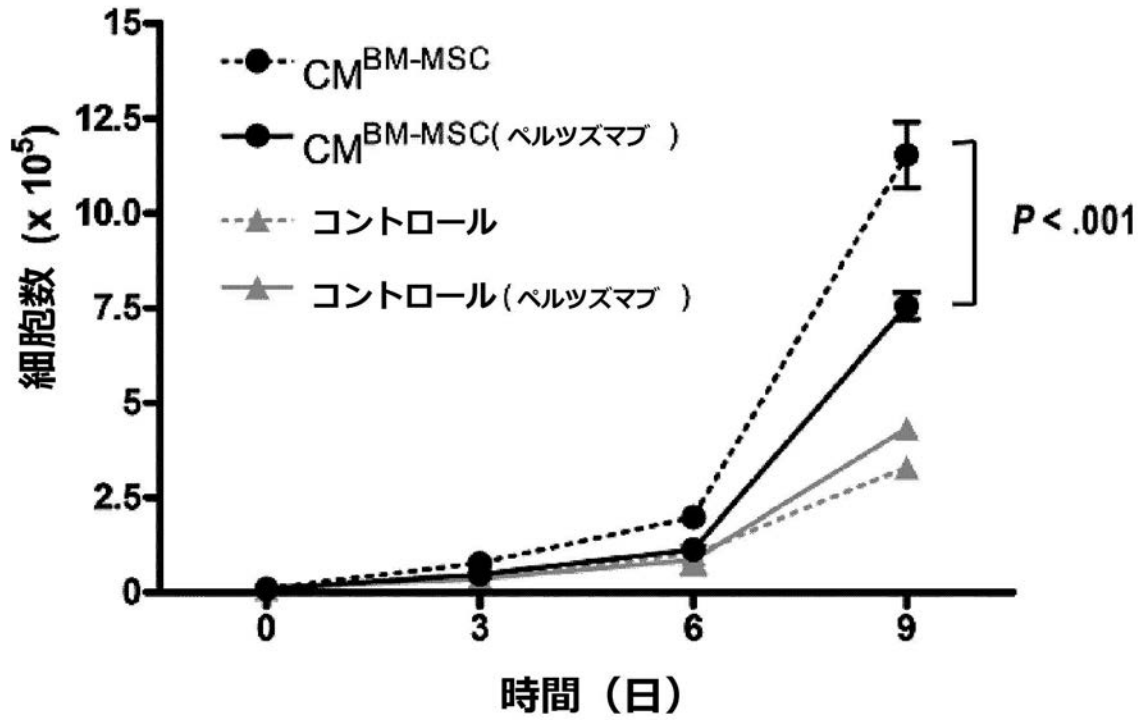
【 図 6 D 】



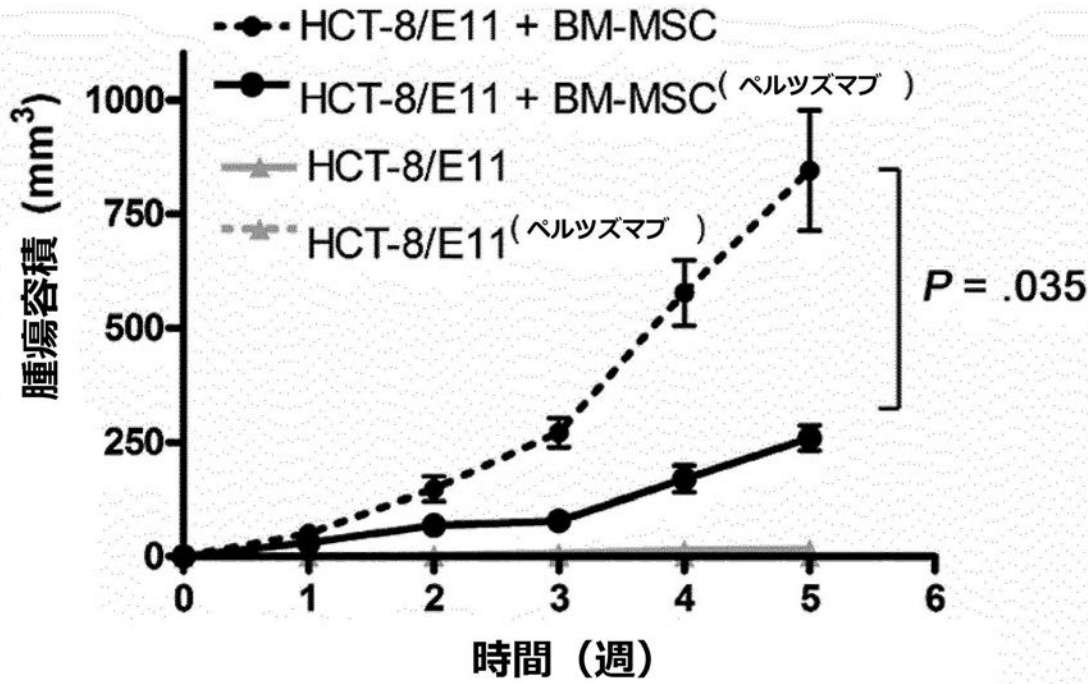
【 図 6 E 】



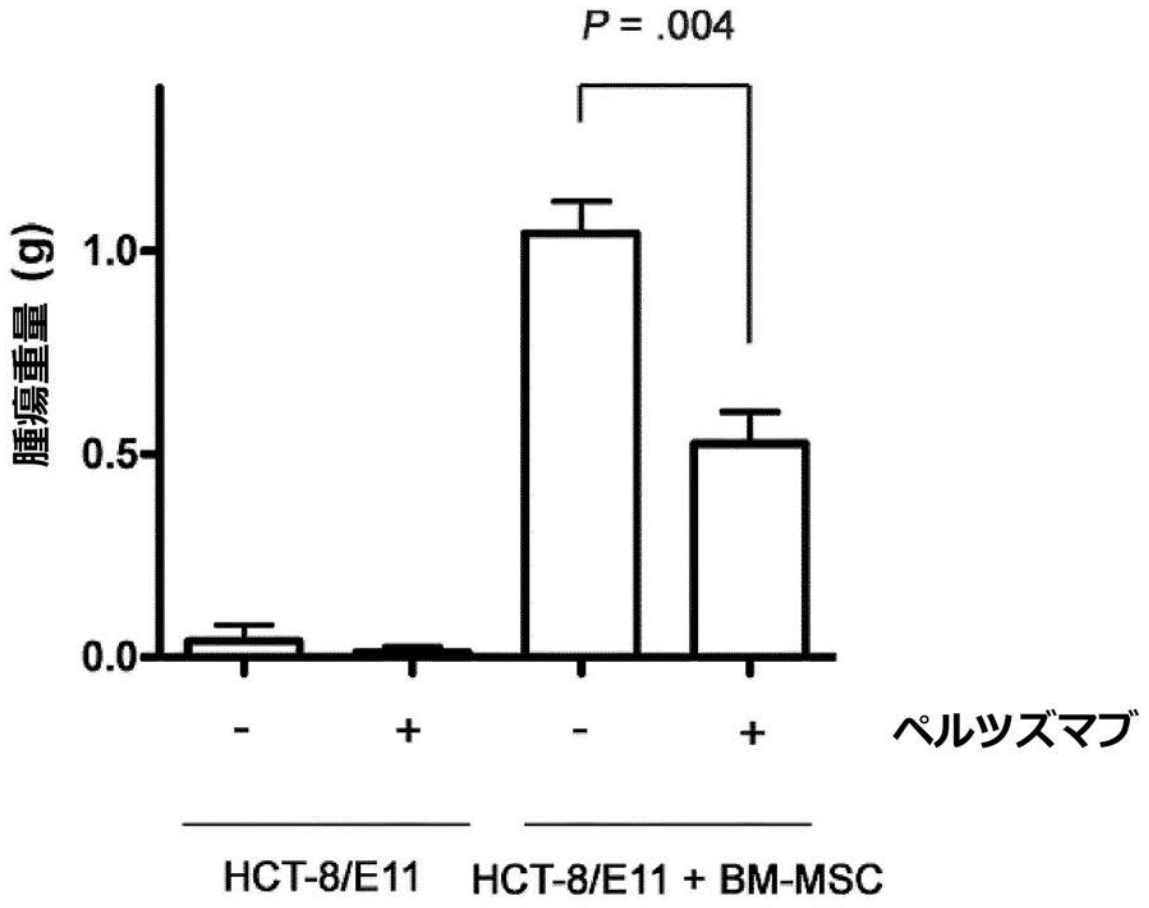
【 図 7 A 】



【 図 7 B 】

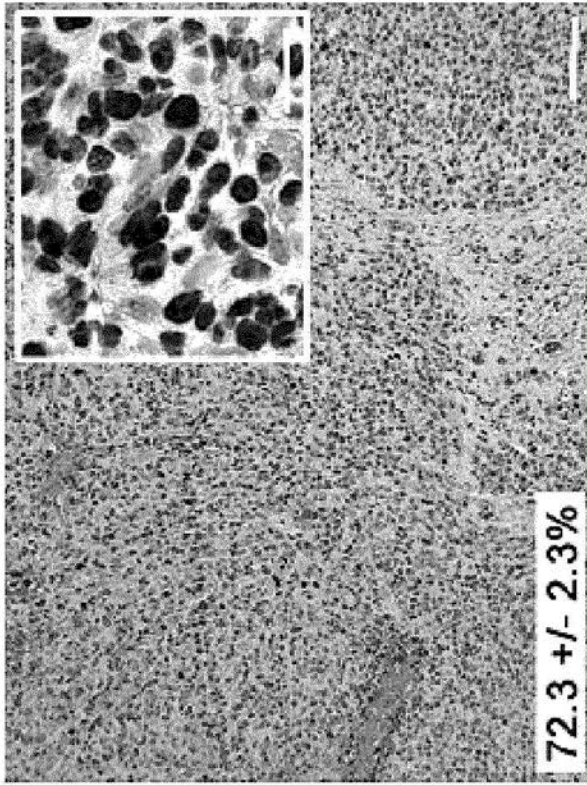


【図7C】

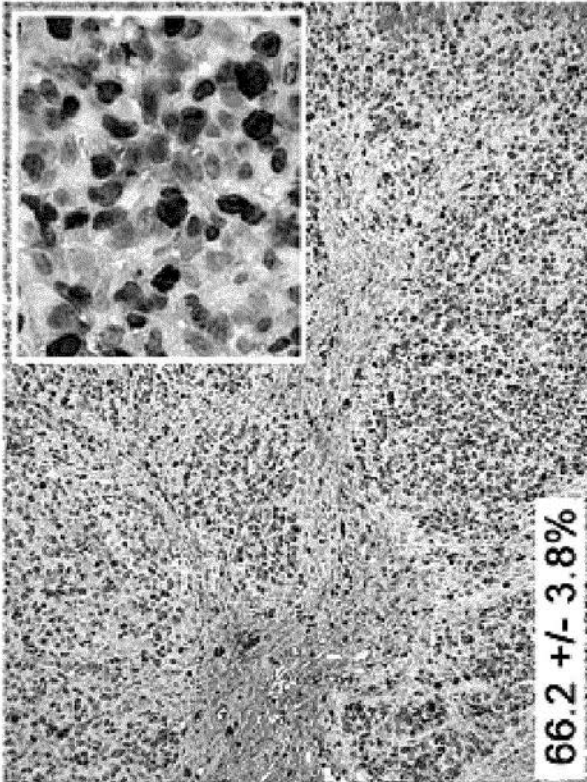


【 図 7 D 】

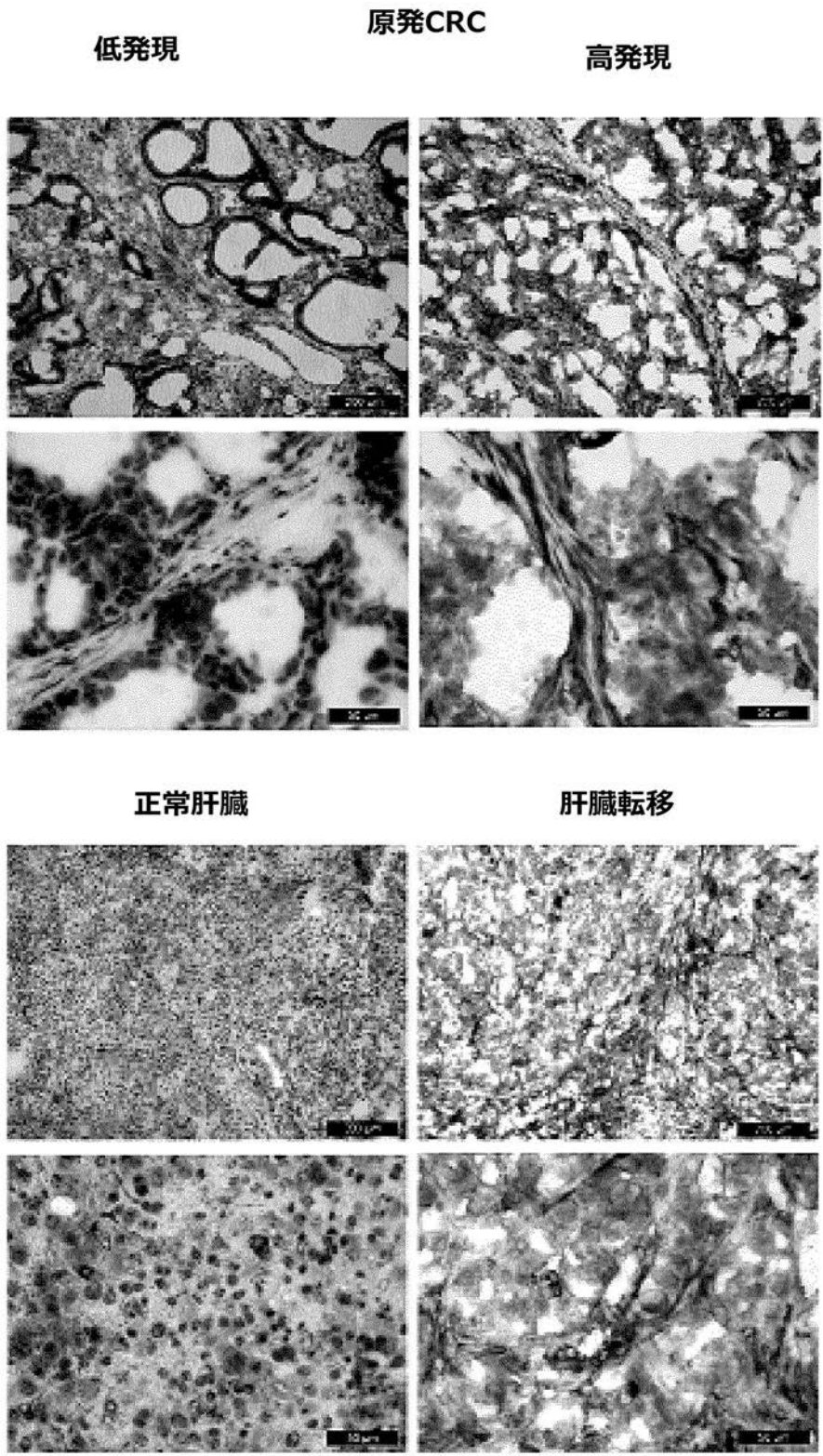
HCT-8/E11 + BM-MSC (ベルツスマフ) 異種移植片



HCT-8/E11 + BM-MSC 異種移植片



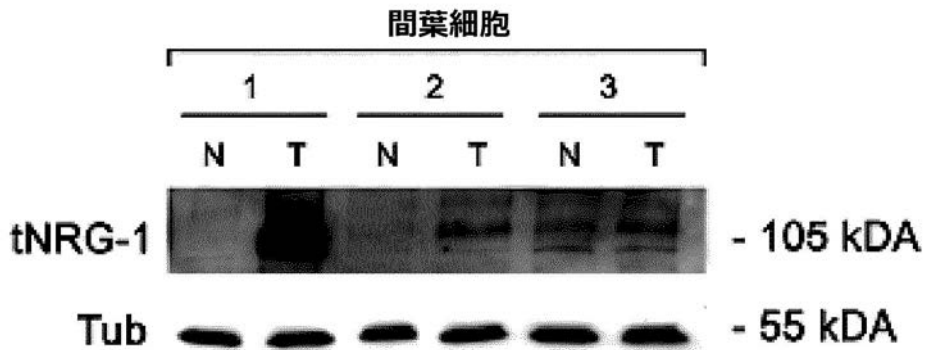
【 図 8 A 】



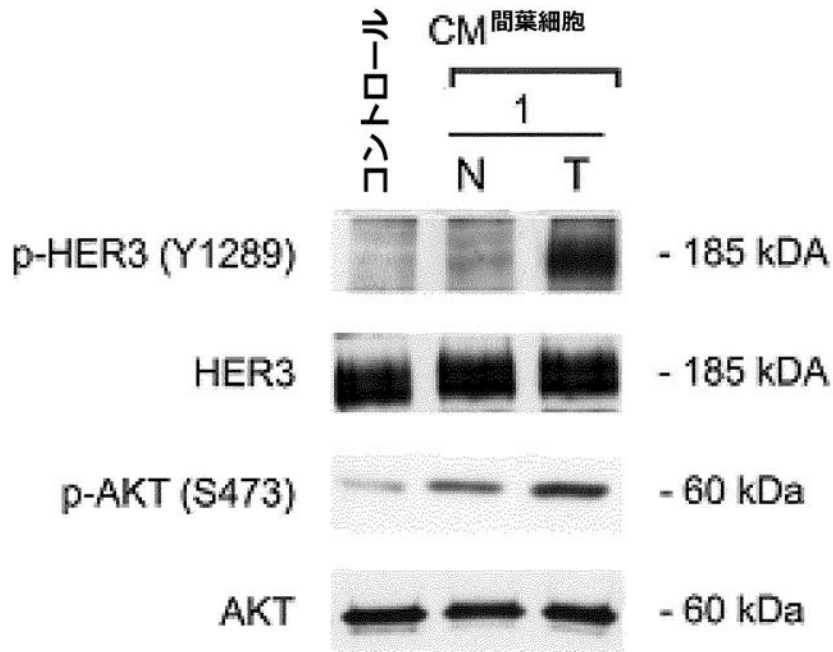
【図 8 B】

	間質tNRG-1発現		p値
	低	高	
原発腫瘍	13	41	.006
近傍正常	4	0	
浸潤深度	<i>n</i> = 13	<i>n</i> = 33	.04
粘膜下(T <sub>1</sub> )	1	1	
固有筋層(T <sub>2</sub> )	5	4	
漿膜下(T <sub>3</sub> )	6	21	
臓側腹膜(T <sub>4</sub> )	1	7	
UICCステージ	<i>n</i> = 13	<i>n</i> = 41	.005
I	6	4	
II	3	12	
III	4	17	
IV	0	8	
5年PFS	8/10 (80%)	6/28 (21%)	.002

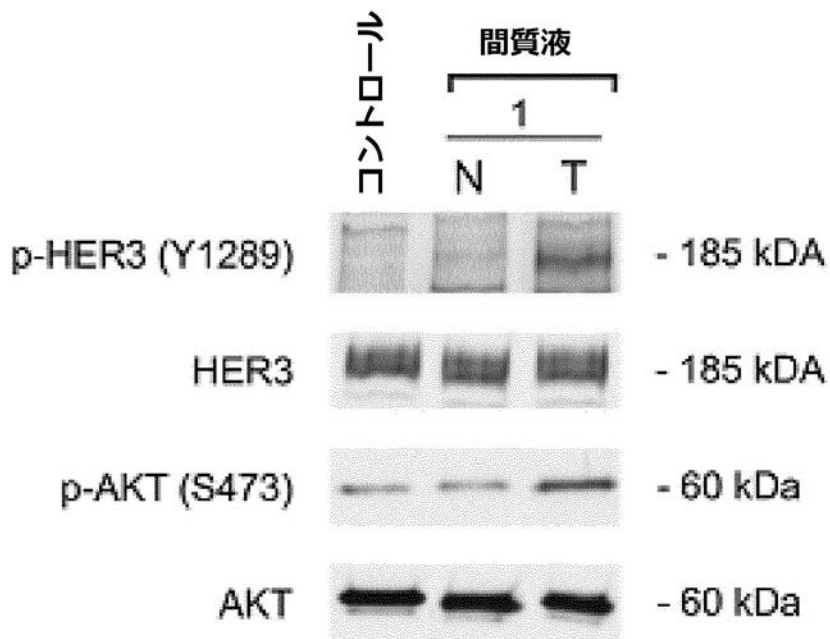
【図 8 C】



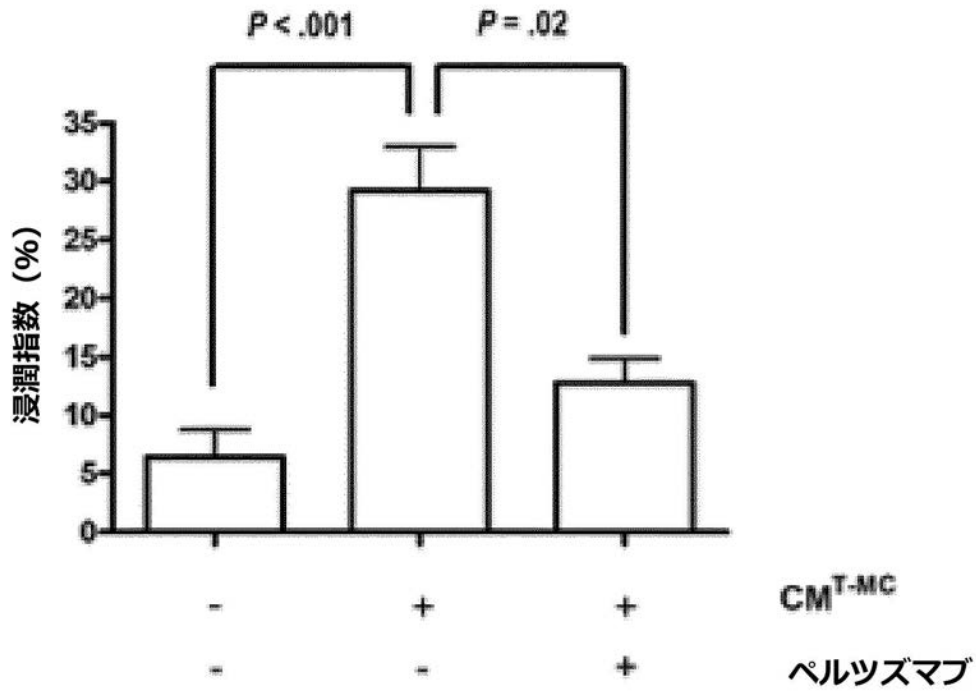
【 図 8 D 】



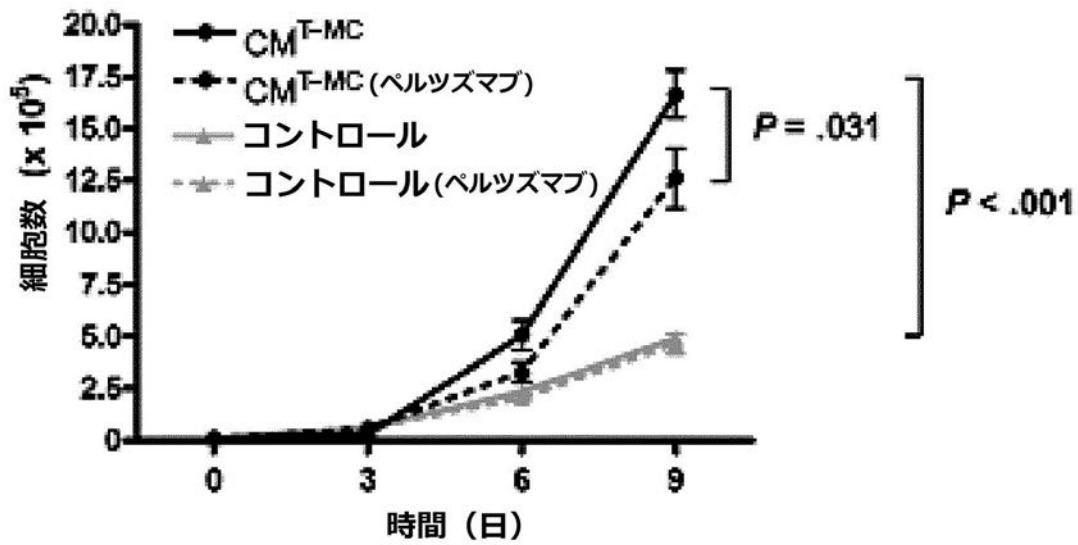
【 図 8 E 】



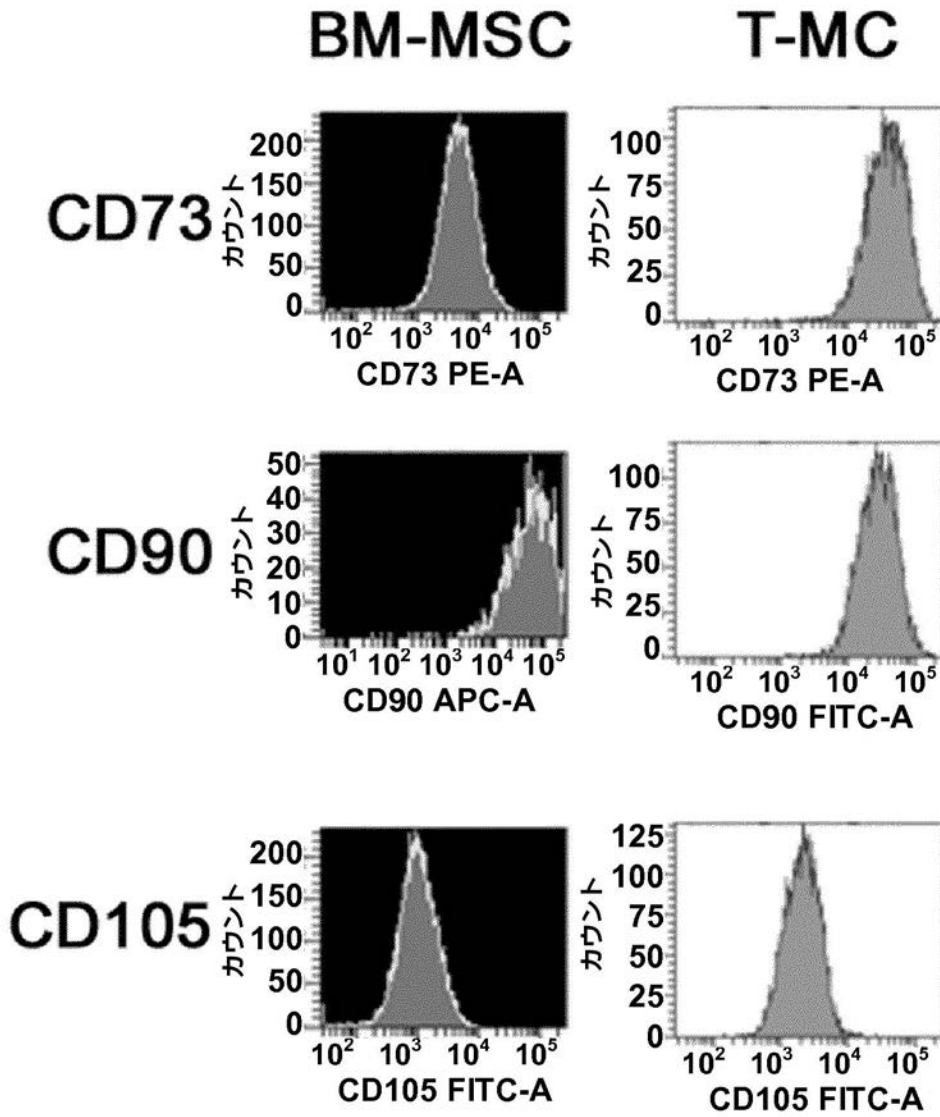
【 図 8 F 】



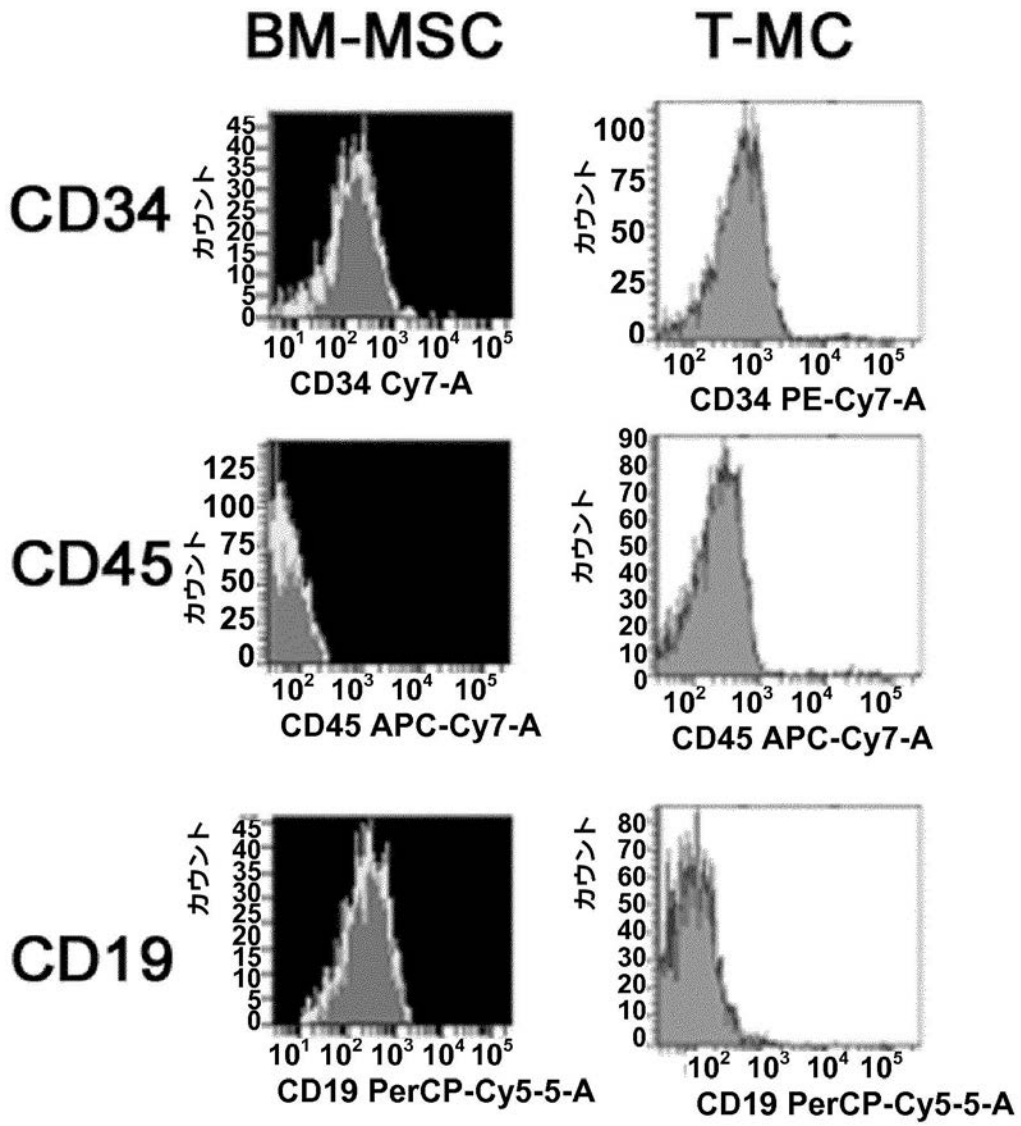
【 図 8 G 】



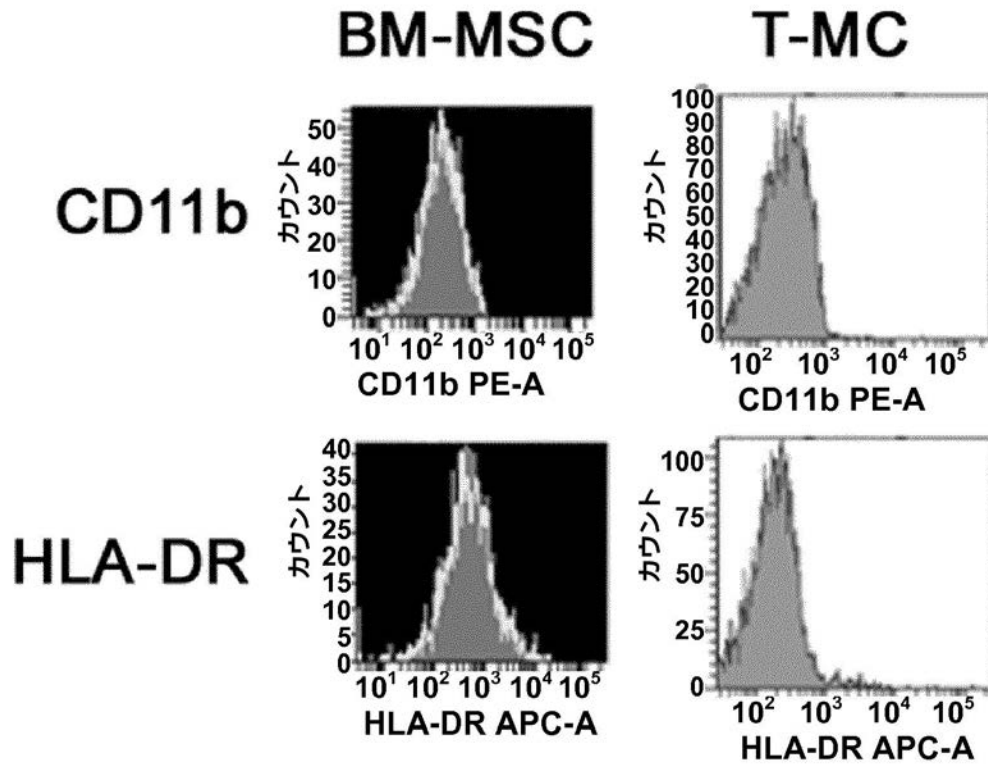
【 図 9 B - 1 】



【 図 9 B - 2 】

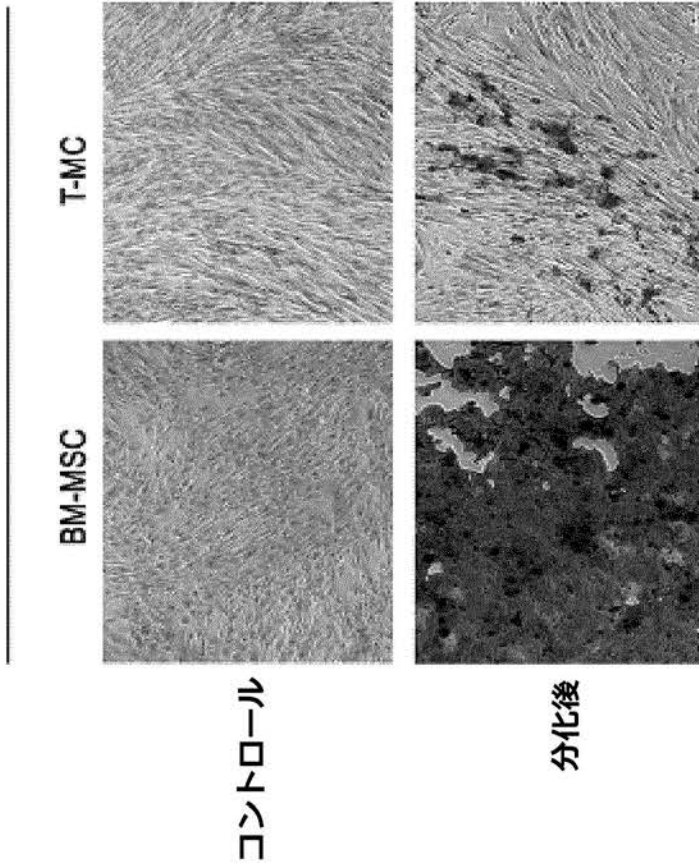


【 図 9 B - 3 】

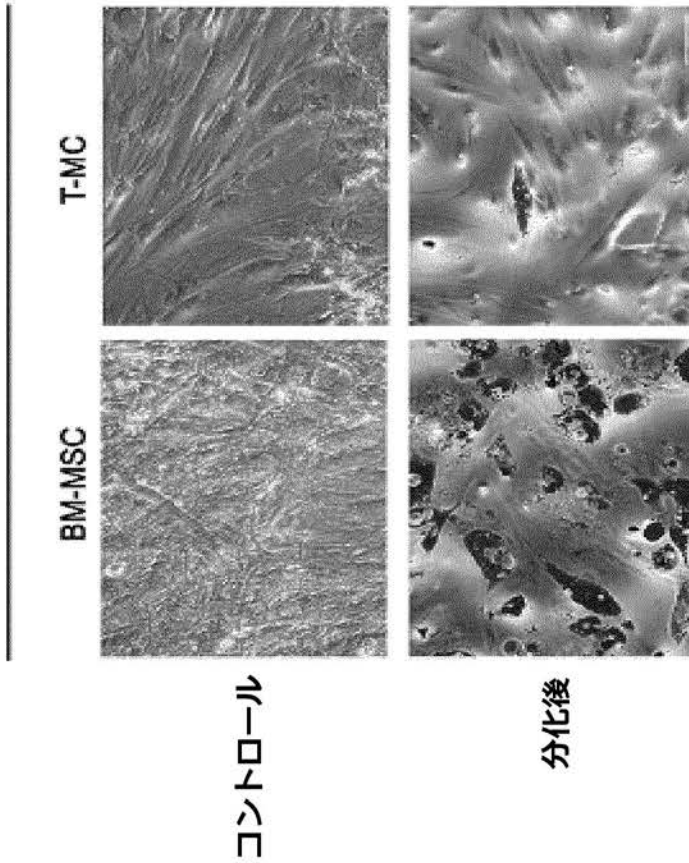


【 図 9 C 】

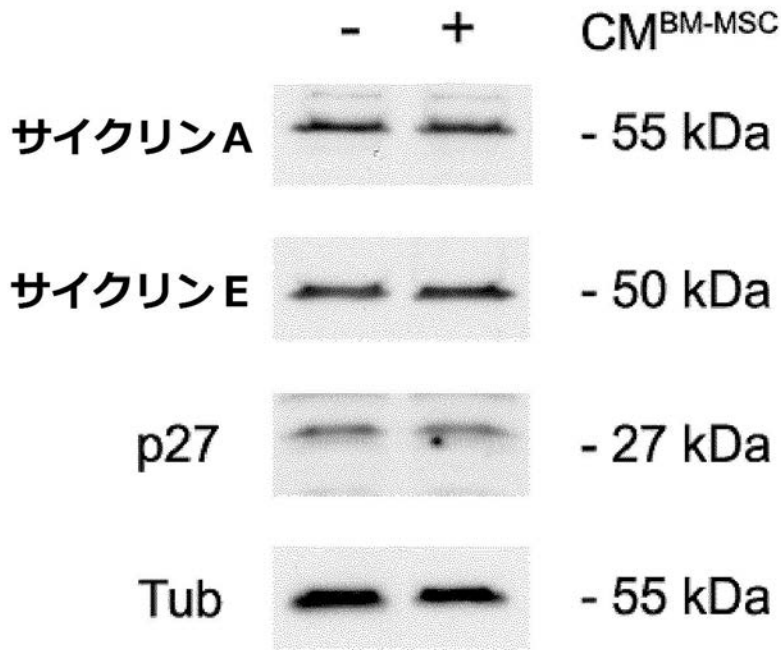
骨細胞化分化



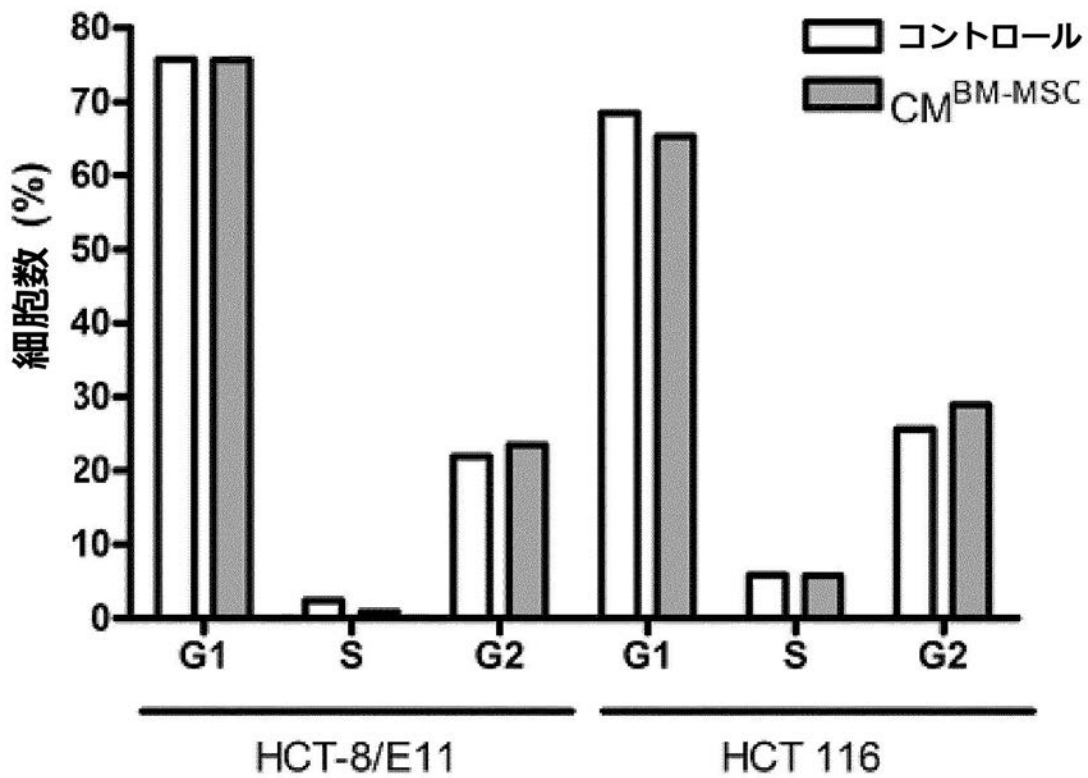
脂肪細胞化分化



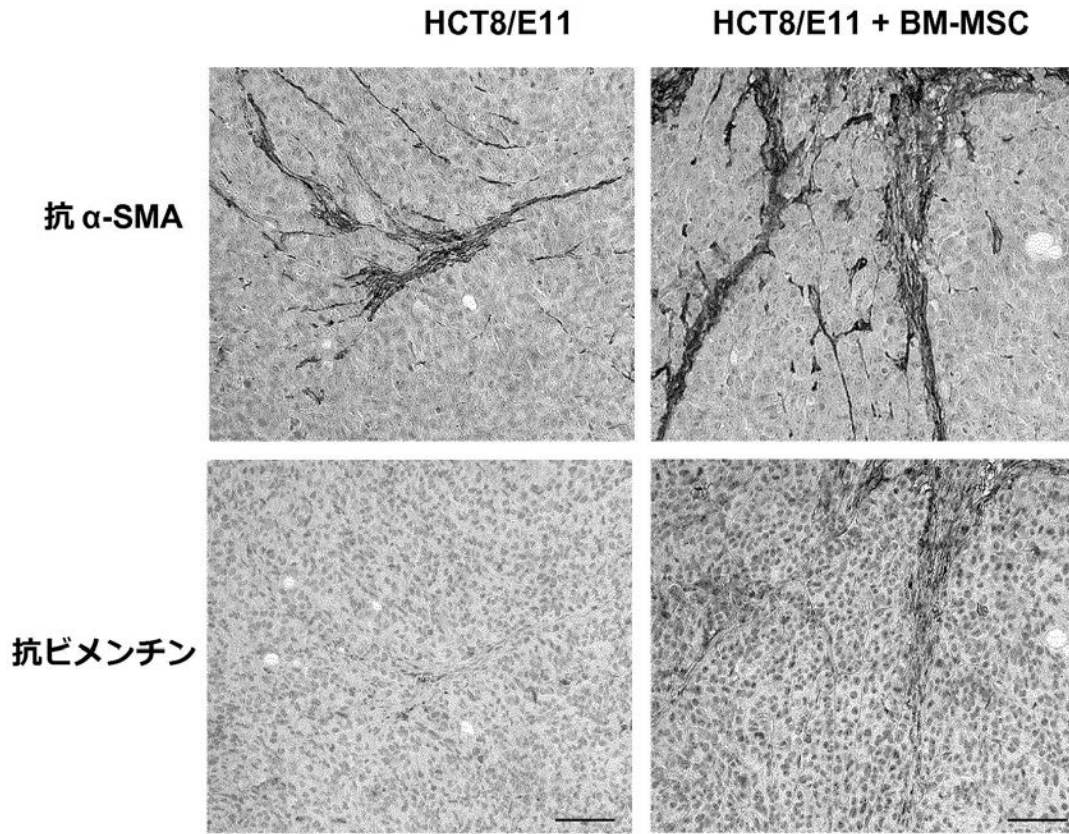
【図10A】



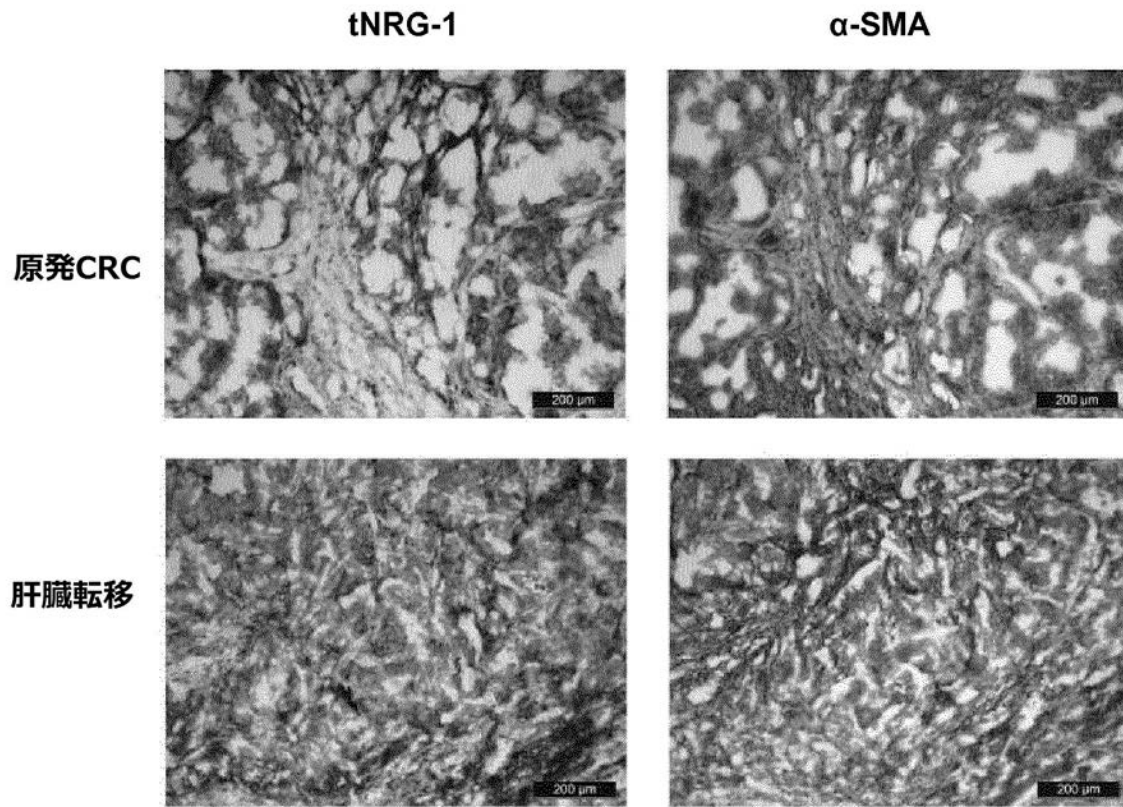
【図10B】



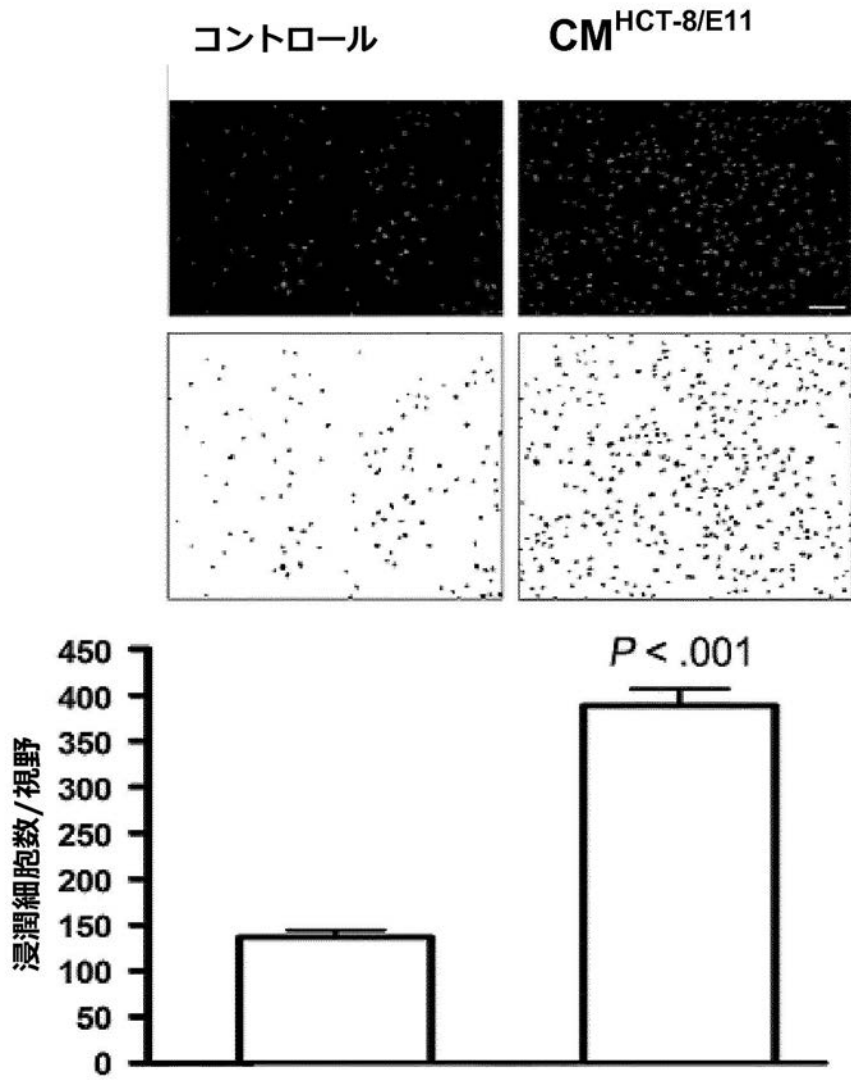
【 図 1 1 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/067758

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/574 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Bernard Depypere: "DE ROL VAN MESENCHYMALE STROMALE CELLEN BIJ TUMORPROGRESSIE IN COLORECTAALKANKER", 6 May 2011 (2011-05-06), XP055049676, Retrieved from the Internet: URL:http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/001/ 787/901/RUG01-001787901_2012_0001_AC.pdf [retrieved on 2013-01-15] chapter 9.8. Neureguline-1, discussion; figure 20 ----- -/--	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
16 January 2013		28/01/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Rosin, Oliver

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/067758

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>Srinivas Venkateswarlu ET AL: "Autocrine heregulin generates growth factor independence and blocks apoptosis in colon cancer cells", Oncogene 2002 21, 3 January 2002 (2002-01-03), pages 78-86, XP055019437, DOI: 10.1038/sj/onc/ Retrieved from the Internet: URL:http://www.nature.com/onc/journal/v21/n1/pdf/1205011a.pdf [retrieved on 2012-02-15] the whole document</p>	1
A	<p>Atsushi Tatsuguchi ET AL: "Clinical Significance of Heregulin and Phosphorylated ERBB Receptor Family Expression in Colorectal Cancer", Gastroenterology MAY 2011; Digestive Disease Week 2011; Chicago, IL, USA; May 07 -10, 2011 VOL - 140 NR - 5, Suppl. 1, 11 April 2011 (2011-04-11), page S340, XP055019561, Retrieved from the Internet: URL:http://pdn.sciencedirect.com/science?ob=MiamiImageURL&amp;cid=273440&amp;user=987766&amp;pii=S001650851161384X&amp;check=y&amp;origin=article&amp;zone=toolbar&amp;coverDate=31-May-2011&amp;view=c&amp;originContentFamily=serial&amp;wchp=dGLbV1S-zSkzV&amp;md5=b9666feb099e8ac64e753e6031d07cc9/1-s2.0-S001650851161384X-main.pdf [retrieved on 2012-02-16] abstract</p>	1
A	<p>MASAOKI YONEZAWA ET AL: "ErbB kinase and heregulin signaling and their role on VEGF secretion in colon cancer cells", GASTROENTEROLOGY APR 2004; DIGESTIVE DISEASE WEEK/105TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-GASTROENTEROLOGICAL-ASSOCIATION; NEW ORLEANS, LA, USA; MAY 16 -20, 2004; VOL - 126 NR - 4, SUPPL. 2, 1 January 2004 (2004-01-01), page A263, XP055019581, abstract</p>	1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/067758

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KAPITANOVIC ET AL: "The expression of p185(HER-2/neu) correlates with the stage of disease and survival in colorectal cancer", GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, vol. 112, no. 4, 1 April 1997 (1997-04-01), pages 1103-1113, XP005688699, ISSN: 0016-5085, DOI: 10.1016/S0016-5085(97)70120-3 the whole document -----	1
A	ASTRID DE BOECK ET AL: "Resident and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in head and neck squamous cell carcinoma", ORAL ONCOLOGY, vol. 46, no. 5, 1 May 2010 (2010-05-01), pages 336-342, XP055049450, ISSN: 1368-8375, DOI: 10.1016/j.oraloncology.2010.01.016 the whole document -----	1
A	DE WEVER OLIVIER ET AL: "Modeling and quantification of cancer cell invasion through collagen type I matrices", THE INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY SPAIN 2010,, vol. 54, no. 5, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 887-896, XP008159251, DOI: 10.1387/IJDB.0929480W the whole document -----	1
A	DENYS HANNELORE ET AL: "The extracellular matrix regulates cancer progression and therapy response: implications for prognosis and treatment", CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS LTD, NL, vol. 15, no. 12, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 1373-1384, XP008159250, ISSN: 1873-4286 the whole document -----	1
A	YONEZAWA MASAOKI ET AL: "Heregulin-Induced VEGF Expression via the ErbB3 Signaling Pathway in Colon Cancer", DIGESTION, S. KARGER AG., BASEL, CH, vol. 80, no. 4, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 215-225, XP008159253, ISSN: 0012-2823 abstract -----	1

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 100166936

弁理士 稲本 潔

(74)代理人 100174883

弁理士 富田 雅己

(72)発明者 デ ウィヴァー, オリヴィエ

ベルギー、ビー - 9 0 7 0 デステルベージェン、パーク テン ボッセ 4

(72)発明者 デ ボエック, アストリッド

ベルギー、ビー - 9 2 5 5 ブヘンハウト、ポストラート 3 3

Fターム(参考) 2G045 AA26 CB01 DA44

专利名称(译)	基于神经调节蛋白-1在结直肠癌中的预后和治疗分层		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014526680A</a>	公开(公告)日	2014-10-06
申请号	JP2014529027	申请日	2012-09-12
[标]申请(专利权)人(译)	UNI-DF威赛水泥音乐厅 根特大学		
申请(专利权)人(译)	UNI-DF威赛根特		
[标]发明人	デウィヴァーオリヴィエ デボエックアストリッド		
发明人	デウィヴァー,オリヴィエ デボエック,アストリッド		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 G01N33/48		
CPC分类号	G01N33/57419 G01N2333/4756 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/574.B G01N33/53.V G01N33/48.ZNA.P		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CB01 2G045/DA44		
代理人(译)	清稻本润一 富田雅美		
优先权	2011180878 2011-09-12 EP		
其他公开文献	JP6208131B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及大肠癌的预后，治疗分层和治疗。更具体地，本发明提供了患者在存在于患者样品中的肿瘤相关间充质细胞中跨膜1型神经调节蛋白-1水平的显著增加，从而据揭示，与低神经调节蛋白-1水平的患者相比，预后更差。此外，本发明利用肿瘤相关的间充质细胞中的跨膜1型神经调节蛋白-1表达来预测在结直肠癌的治疗期间和/或神经调节蛋白-1患者中对HER1抑制剂的抗性。1和/或基于阻止HER3活性预测是否受益于治疗。[选型图]图1A