

厚生科学研究研究費補助金

がん克服戦略研究事業

新しい薬物療法の研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 西條 長宏

平成14年(2002年) 4月

目 次

I. 総括研究報告		
新しい薬物療法の研究	-----	1
西條長宏		
II. 分担研究報告		
1. 分子化学療法による進行がんの制御に関する研究	-----	14
西條長宏		
2. がん細胞の栄養飢餓耐性を標的とした治療法の開発	-----	19
江角浩安		
3. がん化学療法の分子標的の同定と個別化	-----	22
桑野信彦		
4. 抗がん剤の第I相試験の新しい方法論の開発	-----	26
佐々木康綱		
5. 薬物療法の有効性を決定する要因の解析	-----	28
杉本芳一		
6. 初期臨床試験での作用機構に基づく新薬の適正評価	-----	30
田村友秀		
7. 分子標的薬剤の分子機序の同定と治療の個別化へ向けての基礎的検討	-----	32
西尾和人		
8. 新抗悪性腫瘍薬の早期臨床試験の研究	-----	36
福岡正博		
9. 新規癌転移血管新生阻害剤 NK4 による癌治療研究	-----	39
松本邦夫		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	42
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	48

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）総括研究報告書
研究テーマ：新しいがん薬物療法の研究

主任研究者 西條 長宏 国立がんセンター中央病院 部長

研究要旨 プラチナ耐性非小細胞がんに対しても約 30%の奏効率と長期の奏効期間を示しうるチロシンキナーゼ阻害剤 ZD1839 の作用機序の解明を目的として ZD1839 耐性細胞 PC-9/ZD を樹立した。MNNG 処理後 IC90 の ZD1839 と接触させ増殖してきた細胞を用いた。PC-9/ZD は ZD1839 に対し母細胞と比べ 122 倍の耐性を示したが既存の抗悪性腫瘍薬とは交差耐性を示さなかった。EGFR の発現は耐性細胞において高かった。転写因子として知られ紫外線や外界ストレスにより核内移行をする YB-1 の乳がん、骨肉腫における核での発現と MDR1 遺伝子の発現には相関がみられた。卵巣がんでは核移行と予後の相関がみられた。また非小細胞がんでは特に扁平上皮がんにおいて臨床病期と相関がみられた。YB-1 核移行群では YB-1 細胞質群に比べ予後不良であった。ABC-transporter の一つである BCRP の cDNA 導入細胞 K562/MycBCRP を作成した。K562/MycBCRP は SN-38、Mitoxantrone、Topotecan に対し 21 倍、11 倍、8 倍の耐性を示した。K562/MycBCRP のこれらの薬剤耐性は estrogen により克服された。BCRP は胎盤よりの estrogen 排出に関与していることが示唆された。estrogen 誘導体を用いることにより BCRP 耐性克服が可能と思われた。HGF アンタゴニスト NK4 の抗腫瘍活性をヌードマウスに移植した LLC、A549、H358（いずれも肺がん細胞）の系で検討した。NK4 タンパクをがん細胞近傍に持続的投与するとがん組織における腫瘍血管新生が阻害されるとともにがん細胞のアポトーシスが増加し、がんの増殖が抑制された。NK4 アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療によっても同様の機序によってがんの増殖抑制がみられるとともに NK4 ベクター投与局所のみならず遠隔の腫瘍に対する効果も認められた。分子標的治療薬の評価には分子標的治療薬が目的とする分子標的に作用することによって抗腫瘍効果がえられたことを証明する仮説の検証（translational research）が必須である。FTI の第 I 相試験において仮説の検証を行うため FTI 投与前後の末梢血リンパ球における遺伝子変化を DNA マクロアレーで検討し Q-Qplot および主成分解析を行った。Rho family 遺伝子および FTI 関連遺伝子が投与量に依存し変化することが示された。分子標的薬の評価ではサロゲートマーカーの変動の検討も重要である。SD/PD 症例の臨床効果の指標として腫瘍マーカーの変動を用いる妥当性は示されなかった。分子標的治療薬投与後の FDG-PET を用いた効果判定によると PET は CT より良好な評価を示す傾向が認められた。

分担研究者

西條長宏（国立がんセンター中央病院部長）、江角浩安（国立がんセンター研究所支所支所長）、桑野信彦（九州大学大学院医学研究院教授）、佐々木康綱（国立がんセンター東病院医長）、杉本芳一（財）癌研究会癌化学療法センター部長）、田村友秀（国立がんセンター中央病院医長）、西尾和人（国立がんセンター研究所室長）松本邦夫（大阪大学大学院医学系研究科助教授）、福岡正博（近畿大学医学部教授）

A. 研究目的

当研究班は①がん化学療法の感受性・耐性を左右する分子標的の同定と新しい分子標的に対する抗がん剤（分子標的治療薬を含む）の開発、②耐性克服法の検討とその臨床導入、③臨床における正確かつ効率の良い第 I

相、第 I/II 相試験の体制および方法論の開発、を行うことによりわが国における抗悪性腫瘍薬の開発とそれを用いた治療がどうあるべきかの方向性を示す。具体的には、様々な薬剤耐性細胞とその母細胞について抗がん剤と接触前後の遺伝子発現の変化を cDNA アレーを用い分析し各抗がん剤毎に感受性・耐性に関与する責任遺伝子を同定する。カスタム cDNA アレーを作成し方法論の確立とバリデーションを行う。同時に臨床検体についても薬剤と接触前後の遺伝子発現の変化を検討し薬剤感受性との相関を分析する。今までに薬剤のトランスポートに関わる遺伝子の同定を試み cMOAT/MRP2、MRP3、SMRP/MRP5 のクローニングを行ってきた。またこれらのトランスポーターの関与する薬剤の同定を行ってきた。既にシスプラチン耐性を K201 が、アドリアマイシン耐性をピリジン誘導体が克服しうる事を証明してい

るが、様々な耐性細胞に対する効果の普遍性を検討するとともに臨床導入の可能性の検討を行う。新しい分子標的に対する薬として抗 GM2 抗体、抗 VEGF 抗体、HGF に対するアンタゴニスト (NK4) が *in vivo* で強い抗腫瘍効果を示す事に着目しその臨床導入にむけての検討を進める。また、既に臨床で直接抗腫瘍効果の認められているチロシンキナーゼ阻害剤 (ZD1839) の作用機序を解明する。新しいチユプリン重合阻害剤、DNA minor groove binder, 更に新しい分子標的治療薬について *in vitro*, *in vivo* 抗腫瘍効果を検討する。分子標的治療剤については臨床効果の予測性の高いサロゲートマーカーを追及し効果的かつ効率の良い分子標的治療を具体化する。臨床導入可能となった化合物については臨床第 I 相、第 I/II 相試験でその効果・毒性をヒトに対し検討する。そのための組織づくり・モデル的研究体制を行う。第 I 相試験の過程では pharmacokinetically guided dose escalation, continued reassessment method, limited sampling model など逐次しより科学的かつ効率のよい第 I 相試験を行う。

B. 研究方法

EGFR 特異的レセプター型チロシンキナーゼ阻害剤 (PTI) の作用機序の検討をした。各種ヒト癌細胞株に対する細胞増殖抑制効果を *in vitro* で検討し、EGFR の発現量、EGFR の自己リン酸化の程度、また PTI 接触時の EGFR のリン酸化抑制効果の程度との相関性を検討した。PTI 耐性細胞の樹立を 3 つの方法で試みた。1) 長時間低濃度の PTI に持続的に接触し、接触濃度を次第に増加させ、増殖速度の速いクローンを選択する方法 2) Mutagen を短時間接触させた後、PTI に接触、生存クローンを選択する方法 3) 肺癌細胞を移植した担がんマウスに、PTI を静脈内投与し、皮下腫瘍の縮小後、再増殖した細胞を株化する方法を用いた。樹立した耐性細胞の性状解析を行った。①各種既存抗がん剤、キナーゼ阻害剤による細胞増殖抑制効果の *in vitro* における検討、②マウス皮下に移植した細胞の ZD1839 投与による増殖抑制効果の検討、③耐性細胞における、EGFR 蛋白質およびそのリン酸化、PTI によるリン酸化抑制効果の検討、④cDNA アレイを用いた、耐性株において発現の変化している遺伝子群の選択をおこなった。

がん治療薬の分子標的の同定を行うとともにその発現レベルを検討した。Northern blot, 定量 PCR と免疫染色法を用いてがん細胞やヒトがんの材料などの各種遺伝子レベルを定量化した。DNA メチレーションの有

無について MSP 法、特異的制限酵素による切断、さらに塩基配列決定などで検討した。各種遺伝子のプロモーター活性について欠失変異導入プロモーターとルシフェラーゼなどを連結させて測定した。血管新生活性については、*in vitro* では血管内皮細胞の遊走や管腔形成能をさらに *in vivo* では、マウス角膜法、マウス背部皮下法、マトリゲル法などを用いた。

BCRP の生理的基質を検索するとともに BCRP の生理的機能の解明を試みた。ヒト胎盤由来の BCRP cDNA に Myc エピトープタグを付加後、Ha レトロウイルスベクターに組み込んでレトロウイルス HaMycBCRP を作成し、これをヒト白血病細胞 K562 に導入して BCRP 発現細胞 K562/MycBCRP を作成した。BCRP の生理的基質を検索するために、K562/MycBCRP 細胞に、それ自体ではあまり増殖阻害効果を示さない 1 ng/ml の Mitoxantrone と種々の被検物質を加えて培養し、4 日後の細胞数の計数により耐性克服作用を調べた。耐性克服作用が認められた物質については、種々の濃度の Mitoxantrone, SN-38, Topotecan との併用により K562/MycBCRP 細胞特異的な殺細胞作用の増強効果を調べた。K562 細胞および K562/MycBCRP 細胞の Topotecan の取り込みを FACS により定量した。これに耐性克服物質を加えることにより K562/MycBCRP 細胞特異的な topotecan 取り込みの阻害を調べた。

NK4 の抗がん効果および NK4 遺伝子治療の *in vivo* 効果を検討した。ヒト肺癌細胞 SUIT-2 を 6 週齢のヌードマウス脾臓に同所的に移植した。NK4 の肺癌への効果を調べるために、肺癌細胞移植後 3 日目より 25 日間連日、あるいは 24 日目より連日 NK4 をマウス腹腔内に 30 μ g/day にて投与した。原発腫瘍の腫瘍体積、腫瘍血管新生、癌細胞のアポトーシス、腹膜への播種性転移、延命効果などを調べた。一方、ヒト NK4 cDNA をアデノウイルスベクターに組み込み、生体内で NK4 を発現させる組み換えアデノウイルスを調製し、ヒト肺癌を移植したヌードマウスを用いて NK4 遺伝子治療の制癌作用を解析した。

R115777 の臨床第 1 相試験において、本薬剤の生体内における標的分子と主なシグナル伝達経路の推定を行った。R115777 の臨床第 1 相試験において、すべての症例において同意を取った後、治療前後の末梢血リンパ球を採取後、一部はファルネシル・トランスフェラーゼ活性を測定し、一部は mRNA を抽出後、cDNA マクロアレイにより遺伝子発現プロファイルの変化を測定した。遺伝子発現プロファイルの変化に関しては、R115777

の投与量依存的変化をQQプロット解析により投与量依存的に変化する遺伝子の存在を、また主成分解析の返報であるBi-plot解析によりその遺伝子の特定を試みた。

抗悪性腫瘍薬を評価するための“biological marker”としてのPositron Emission Tomography (PET)の意義について検討した。本研究では、cyclin dependent kinase (CDK)の阻害薬でありcell cycle modulatorとして抗腫瘍活性を呈するFlavopyridolの第I相試験に登録されている症例を対象として治療前後におけるPETの評価を行った。Flavopyridolは、24時間の持続点滴静注法によって週1回、4週連続で投与した。FDG-PETは、whole body PET scannerによってFlavopyridolの投与前と各コース終了後に撮影した。PETによる効果判定の指標としては、standard uptake value (SUV)を用いた。

効果のサロゲートマーカーとしての腫瘍マーカー変動の意義を画像評価との対比において検討した。4つの分子標的薬剤の第I相試験において画像評価がNCまたはPDであった61症例を対象とした。この61例のうち、1種以上の腫瘍マーカーが高値であり、かつ治療開始前約1か月、治療開始時、治療開始後約1か月の3ポイントの腫瘍マーカー値が判明している43例について調査した。まず、治療期間中の腫瘍マーカーの変動と画像評価との関係、次いで治療開始前約1か月間の腫瘍マーカー上昇率と治療開始後約1か月間の上昇率から治療前後の腫瘍マーカー上昇率の変化を求め、解析した。腫瘍マーカーは各症例1項目とし、複数の腫瘍マーカーが高値の場合は基準値に比しより高値のものを選択した。

がん細胞の栄養飢餓耐性のメカニズム解析に関しては、すでに我々が見出している顕著な栄養飢餓耐性を示すPANC-1細胞を中心に、栄養飢餓時における細胞の反応を解析し、耐性のメカニズムへの関与をアンチセンスRNA発現ベクターや、阻害剤を用いて解析した。治療法の開発に関しては、簡便なスクリーニング系を作り幅広く薬剤を探し出し、これが治療に使うかどうかを主に動物実験を中心に検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験においては必要最小動物数を用いるとともに適正な飼育を行う。ト殺は苦痛を伴わないよう配慮するとともに大きな腫瘍を担がん状態で長期飼育し苦痛を与えるようなことはしない。臨床試験はGCPに準じ全てのプロトコールは各施設の臨床試験審査委員会の許可の下に行う。また効果安全性評価委員により研究の続行中止などに関するアドバイスを受ける。

C. 研究結果

ヒト癌細胞株におけるZD1839の*in vitro*増殖抑制効果メカニズムの解析： 約20種類のヒト癌細胞に対するZD1839のIC₅₀は10 μM前後であったが、K562/TPAおよびPC-9細胞、PC-9/CDDP細胞では、0.02と約千倍高感受性であった。各種細胞においては、EGFRの自己リン酸化がZD1839により抑制されたが、IC₅₀とEGFR発現量との相関は認められなかった。K562およびK562/TPAにおいては親株の約千倍程度の感受性の差異を認めたが、これはEGFRの発現の違いにより説明された。すなわちEGFRの発現のない親株に対して、K562/TPAはEGFRの高発現によりPTIに対する感受性は増加したと考えられた。一方、ヒト非小細胞肺癌PC-9およびPC-14細胞間においても約千倍の感受性の差異が認められたが、EGFRの発現量には、有意な差異を認めなかったが、PTI投与後のEGFRのリン酸化抑制効果に差異を認めた。PTIはEGFRのATP結合部位に競合的に結合する小分子化合物であることからEGFRのATP結合領域における塩基配列を検討した。感受性細胞においては感受性であるPC-9においてむしろ遺伝子欠損が認められ、耐性機序は同部位の遺伝子変異では説明できなかった。

ZD1839の耐性細胞の樹立とその性状解析：

Mutagen処理にて樹立した1つの耐性クローンPC-9/ZDはZD1839に対し親株に比し約300倍の耐性を示した。各種既存抗がん剤に交差耐性をしめさず、多剤耐性とは考えられなかった。また各種チロシンキナーゼ阻害剤に対する交差性を検討したところ、他のチロシンキナーゼレセプターに対する特異的PTIには感受性であった。EGFR特異的阻害剤に対しては、感受性および耐性を示すものに2分されたが多くのPTIに対して感受性であった。すなわちPC-14/ZDはZD1839に対する特異的な耐性形質を獲得していると考えられた。同細胞をマウス皮下に移植しZD1839投与による細胞増殖抑制を検討し、同細胞は*in vivo*においてもZD1839に耐性を示すことが示唆された。EGFRの発現および自己リン酸化は、耐性株においてむしろ増加していたが、PTIによるEGFRのリン酸化抑制効果は耐性株において有意に低下していた。両細胞株のEGFR結合領域の遺伝子配列に差はなかった。

cDNAアレイによる遺伝子発現解析においてPTI暴露により親株でアポトーシス関連遺伝子の増加、耐性株で細胞周期関連遺伝子の増加が認められ、これらが耐性・感受性を区別する遺伝子であることが示唆された。

がん治療薬の分子標的同一とその発現レベルの検討では MRP1 と MRP3 はヒト・グリオーマ細胞において発現が見られたシスプラチンやエトポシドの感受性と関連した。さらに、ヒト膀胱がん症例においては、膀胱内注入療法や全身化学療法後の再発腫瘍において MDR1 や MRP3 遺伝子の発現レベルの有意な上昇が見られた。担がん白血球マウスにおいて治療抵抗性を示す時期に P-糖蛋白質の発現上昇が見られた。その機序としてプロモーター領域にレトロウイルス LTR 配列の挿入が見出された MRP2 は肝臓において毛細血管側に局在するが、その頂側膜での局在に C-末端が重要であることを明らかにした。さらに C 型の肝炎ウイルス感染症例において肝臓の MRP2 の減少が見られた。ヒト腸で発現する ABC トランスポーター MRP3 は胆汁酸によって著明にヒト腸細胞で上昇する。その上昇に FTF が関与することを明らかにした。血管新生阻害因子アンジオスタチンがヒト前立腺がんを発現しており、PSA 発現と相関することを報告した。もう一つの血管新生阻害因子トロンボスポンジン発現が EGF/TGF α や TGF β によって上昇する機構を示した。Cap43 遺伝子は腎がんの浸潤マクロファージに発現していた。さらに TP/PDECGF のヒトマクロファージでの IFN γ による発現上昇には GAS エlement が関与していることを発見した。ZD1839 (Iressa) の抗腫瘍機序の一つとして血管新生因子の生産を阻害することが関与することを示した。さらに VEGF 受容体 KDR/Flk-1 の阻害剤 SU5416 が Flt-1 のシグナリングにも影響し、マクロファージの遊走を阻害することを明らかにした。

ヒト胎盤由来の BCRP の cDNA を導入した K562/MycBCRP 細胞は SN-38, Mitoxantrone, Topotecan に対してそれぞれ 21 倍、11 倍、8 倍の耐性を示した。BCRP が特に胎盤で高発現していることから K562/MycBCRP の抗癌剤感受性に対する女性ホルモンの影響を調べたところ、特に Estrogen により BCRP の抗癌剤耐性が克服された。10 μ M の Estrone 存在下、K562/MycBCRP 細胞の Mitoxantrone に対する感受性は 7.5 倍低下して親株 K562 細胞に対して 1.5 倍の耐性しか示さなくなった。同様に、K562/BCRP 細胞の SN-38、Topotecan に対する感受性も約 4 倍低下した。K562 細胞の感受性は変化しなかった。また、3 μ M の Estrone あるいは 3 μ M の Estradiol によって K562/MycBCRP 細胞のこれら抗癌剤に対する感受性は 2 倍から 3 倍亢進した。Estrone、Estradiol は K562/MycBCRP 細胞の Topotecan 取込みを濃度依存性に亢進させたが、K562 細胞の Topotecan 取込みには変化を与えなかった。他の女

性ホルモンについては、Estriol、Pregnenolone は K562/MycBCRP 細胞と K562 細胞の抗癌剤感受性を濃度依存性にわずかに亢進させた。Estriol は K562/MycBCRP 細胞の Topotecan 取込みを濃度依存性に増加させた。Progesterone は K562/MycBCRP 細胞と K562 細胞の Mitoxantrone の感受性を亢進した。以上より、BCRP による抗癌剤耐性が Estrone、Estradiol により克服されることが明らかになった。Estrone、Estradiol は BCRP の生理的基質であると考えられた。

SUIT-2 ヒト膀胱癌細胞をヌードマウス膀胱に移植すると、移植後 2 週間を過ぎると癌の成長が著明になり、その後ヒトにおける膀胱癌の進行と同様に 28 日後には多数の腹膜播種、腹水の貯留、肝転移が認められた。これに対して、移植後 3 日目から、NK4 を連日腹腔内に投与したところ、14 日目までには癌細胞の正常組織への浸潤が抑制され、28 日目には移植膀胱癌の成長が NK4 投与によって抑制された。このとき、NK4 によって腫瘍血管新生が阻害され、これにより癌細胞の細胞死が促進されていた。一方、腹膜播種、腹水の貯留、などは膀胱癌の末期に特徴的な悪性の症状として知られているが、NK4 は腹膜播種、腹水の貯留を強力に抑制した。

次に一般に膀胱癌の早期発見が困難であることを考慮して、癌の成長、播種性転移をきたす移植 24 日目から NK4 を投与開始したところ、コントロールのマウスは移植後 69 日までですべてのマウスが癌で死亡したのに対して、NK4 を投与してマウスは 70 日を経過した時点でも 60% が生存し、末期からの投与においても著明な延命効果を示した。また、このとき NK4 は播種性転移や腹水の貯留を強く抑制し、これにより延命効果をもたらしたものと考えられる。

一方、ヒト肺癌細胞を移植したマウスに NK4 発現用組み換えアデノウイルスを癌組織内に投与したところ、NK4 遺伝子治療によって腫瘍血管新生が阻害され、癌の成長が著しく抑制された。さらに、NK4 の血管新生阻害作用ならびに制癌作用は組み換えアデノウイルスを腹腔内に投与した場合にも認められた。このことは癌組織から離れた組織において発現された NK4 が遠隔の癌に対しても制癌作用をもつことが示唆された。

R115777 投与により末梢リンパ球中でのファルネシル・トランスフェラーゼ活性は抑制された。また、その結果として、HDJ-2(機能は未だ不明の生体内分子)のファルネシル化が阻害されていることが示された。遺伝子発現プロファイルの投与量依存的变化を QQ プロット解析にて検討したところ、FTI 関連遺伝子および Ras 関連遺

伝子群において統計学的に有意な変化を認めた。Bi-plot解析では、第3主成分が投与量依存性を示していることが判明し、第3主成分に対する寄与度から、Rhoファミリーの特定のサブタイプが最も強く投与量依存的遺伝子発現プロファイルの変化 k を示していることが判明した。

Flavopyridolの第I相試験に登録された症例を対象としてPETの“biological marker”としての役割を検討した結果、5症例においてCTとPETの比較が可能であった。5例全例が、CTによる画像診断的評価では、腫瘍の縮小を認めることなくすべてNCと判定された。しかしながらこの中で4例において20%以上のSUVの低下を認めた。このうち1例では41%のSUVの低下を認めるとともに、腫瘍マーカーの低下も同様に認めた。さらに、SUVの低下を認めた症例の多くでは、腫瘍マーカーも低下傾向を示した。しかしながら腫瘍増悪までの時間“time to progression”については腫瘍の多様性とsingle arm trialであるために考察が困難であった。

61例の背景は、男34女27、年齢30-72才、原疾患は非小細胞肺癌27、大腸直腸がん17、小細胞肺癌3、原発不明がん3、胸腺腫瘍3、その他8であった。非小細胞肺癌と大腸直腸がんが全体の7割を占めた。各症例において採用した腫瘍マーカーは、CEAが29例と大半を占め、次いでSLXが4例、ProGRP3例、SCC2例、CA1251例、シフラ1例であった。治療開始時から治療1か月後（治療期間中）の腫瘍マーカーの変動では、10%以上の増加・10%以上の低下は、SD症例で11%・47%、PD症例で67%・19%で、画像評価とある程度の相関を示した。一方、治療前期間と治療期間における腫瘍マーカーの上昇率の変化の検討では、その変動範囲はSD症例19例において-84%か+113%、PD症例21例において-45%から+177%であった。SD症例では、治療期間の腫瘍マーカー上昇率が治療前期間における腫瘍マーカー上昇率より10%以上減少したものが84%を占めた。一方、PD症例においても10%以上の減少は43%に認められた。腫瘍マーカーの上昇率の変動と薬剤の投与量との関係を検討したが、明らかな用量依存性は認められなかった。

がん細胞の一部はグルコース欠乏耐性である事を見いだした。これらの細胞は一般には血管の乏しい膵臓がんや、胃がん大腸がんの未分化なものに多いことが解った。PANC-1細胞を例にしてそのメカニズムを解析した。その結果、PKB/Aktと5'-AMP activated protein kinaseが関与していることを各のantisense RNA発現ベクターを用いて証明した。グルコースが欠乏し酸素が欠乏し

ている状態でのがん細胞のエネルギー代謝を調べた。その結果、主にアミノ酸がエネルギー源になっていると考えられた。このアミノ酸を供給するためには都合よく、多くのがん細胞では栄養飢餓にするとMMP遺伝子の活性化が見られた。具体的には、ヒトの膵臓がん細胞であるPANC-1、肝臓がんであるHepG2、メラノーマである特に顕著なのは、MMP1,3,10,13であった。腫瘍の血流不足による栄養飢餓が細胞レベルで耐性反応と、アミノ酸の需要のために基質を分解し浸潤に結びつく可能性が示唆された。腫瘍の栄養飢餓耐性を解除する薬剤を探索した。その結果、駆虫薬として知られるピルヴィニウム塩に活性があることを見いだした。この薬品は寄生虫のブドウ糖の利用を阻害するとされているが、新たにフマル酸還元酵素の阻害をすることを見いだした。また、がん細胞でのグルコース欠乏によるPKB/Aktの活性化を阻害することも見いだした。ヌードマウスにPANC-1細胞を移植し、十分に腫瘍が大きくなってから対側の皮下に5 μ g/mouse/dayで投与すると、腫瘍形成を有意に抑制することを見いだした。

D. 考察

臨床試験においてPTIの作用機序としてEGFR発現以外の因子が関連していると示唆されていること、同細胞が親株に比し明らかなEGFRの発現量の低下を認めないことから、本研究で樹立した耐性細胞は、ZD1839の感受性規定因子の探索する研究に有用と考えられる。引き続き、同耐性機序の検討を継続するとともに、他の方法で樹立した耐性クローンの性状解析も平行しておこなうことにより、広角的に解析することが可能になると考えられる。

いくつかのABCトランスポーターに関して、親和性を示す抗がん剤が明らかになりつつある。ABCトランスポーターが発現上昇を示す腫瘍に対しては適切な抗がん剤の選択ができると確信している。さらに、肝炎ウイルス感染後に影響を受けるABCトランスポーターを同定したり、関連する遺伝疾患の有無を明らかにすることにより、薬剤の副作用に対しても個別化して対処できるのではないかと考えている。

血管新生や細胞増殖を標的とした分子標的薬剤に関して、EGF受容体阻害剤ZD1839は非常に効率よく血管新生を阻害することが観察された。その機序の一つとして、EGFによって誘導されるVEGF、IL8その他の血管新生因子の生産の阻害や血管内皮への直接効果の可能性について提示した。この作用が生体内で実際に働いて

いるか否かはこれからの課題である。

BCRP による抗癌剤耐性が Estrone、Estradiol により克服されることが明らかになった。BCRP は正常組織では胎盤に最も高発現が見られ、母体胎盤間の物質輸送における役割が推察される。BCRP は胎盤では syncytiotrophoblast に高発現がみられるが、この細胞は実際に Estrone、Estradiol を合成して母体側へ分泌していることが知られている。したがって、Estrone、Estradiol が BCRP の生理的基質である可能性は高い。BCRP の機能を阻害する物質が明らかになったことから、今後は、ステロイドホルモン類縁体や抗ホルモン剤を中心に BCRP の阻害物質をスクリーニングし、耐性の克服による抗癌剤の治療効果に役立てたい。

膵癌の成長阻害は主に NK4 の血管新生阻害作用によってもたらされたと考えられる一方、癌の浸潤や転移阻害には NK4 の HGF アンタゴニスト活性が関与していると考えられる。したがって、膵癌特有の悪性形質に対する NK4 の阻止効果は、NK4 のもつ二機能性 (HGF アンタゴニスト/血管新生阻止) によりはじめて達成されたものと考えられる。

一方、癌治療を目的とした遺伝子治療は多数実施されているが、どの遺伝子を用いるかは遺伝子治療による癌治療の成否を決定する大きな要因である。今回、組み換えアデノウイルスを用いて NK4 遺伝子治療の制癌効果が NK4 タンパク質の投与と同様の制癌作用をもつことが明らかにされた。NK4 遺伝子治療では癌細胞や癌組織に特異的に発現される必要がないことも明らかにされ、NK4 タンパク質の投与とともに、NK4 遺伝子治療も有効な制癌法になることが期待される。

分子標的治療剤の早期臨床試験において、生体内において新規薬剤の標的分子を確認すること、想定されているシグナル伝達経路を確認することは最も重要な知見である。その意味で cDNA マクロアレーの精度、解析方法が提示されたことは重要である。末梢血リンパ球中における遺伝子発現プロファイルの変化と腫瘍細胞中における変化では、本質的に異なることも予想されるが、方法論的にはこのような解析により目的とした結果を得ることができることが本研究にて示された。今後、腫瘍サンプルを用いた検討が可能になった。

抗悪性腫瘍薬の評価において画像診断とともに、薬物動態や標的分子の変化を調べる方法が注目され、これらは臨床効果を予言するための "biological marker" として認識されている。分子標的薬剤の中でもモノクローナル抗体は腫瘍縮小を臨床評価の指標として用いている。し

かしながら分子標的治療薬の中には、必ずしも腫瘍縮小を来すことなく抗腫瘍効果を発現する薬剤が含まれていると想定されている。本年度の研究により、Flavopyridol の投与を受けた症例の中に、CT 上の評価は NC であったにもかかわらず PET による glucose-uptake が低下している症例が観察されたことにより、画像診断上では効果がないと判断されたものの機能的には、細胞増殖が低下している症例が存在することが示唆された。このことは、PET における SUV の低下がさらに腫瘍マーカーの低下と相関する症例も認められたことから、生物学的抗腫瘍効果を表現している可能性が考えられた。しかしながら現在 PET の評価法として汎用されている SUV による評価方法については、依然として解決されなければならない問題が残されている。今後は、SUV による評価に関する基礎的研究を積み重ねるとともに、悪性リンパ腫の評価についても PET を用いる前向き研究を予定している。

腫瘍マーカー値の変動は画像評価とある程度相関することが示唆された。腫瘍マーカーの増加率の低下は多くの SD/PD 症例にみられるものの、臨床的意味のある効果を示すかは現時点では不明かつ疑問である。さらには画像評価における SD 判定が臨床的效果を適切に反映しているかについても確実とはいえない。このような薬剤における画像評価 SD/PD の意義についても、腫瘍マーカーの変動と同様に不明と考えられ、PET などの新たな指標との比較検討が必要と思われる。

新しい治療標的になりうると考えられる生物反応の分子機構の解析を行い PKB/Akt、AMPK の関与を確定した。この反応は阻血下での生体の生理的反応と考えられるが発がんの過程で固定化したものと考えられる。慢性的血流不足の組織に特異性があるとするれば、がん組織特異性を期待できる。前年度で特許申請をした方法で新しい候補薬剤を見いだした。この薬剤はヒトへの使用経験はあるが経口投与であり、あまり吸収されないとされている。今後、静脈や皮下投与による毒性試験まで含めて慎重に検討する必要があるが、企業との提携による開発の方法も考える必要がある。

E. 結論

EGFR 特異的チロシンキナーゼ阻害剤の細胞増殖抑制機序を検討し、同薬剤に対する特異的耐性細胞を樹立した。EGFR の発現量、自己リン酸化以外の感受性規定要因を検索する目的で性状解析の検討を開始した。EGFR 下流シグナル、アポトーシス関連因子が因子として選択

されつつある。これらの抗腫瘍効果に関わる因子の同定は個別化治療にむけて重要であると考えられる。

ABCトランスポーターのうち、MRP2やMRP3が親和性を示す抗がん剤を明らかにした。さらにヒトグリオーマや膀胱がんにおいてMRPファミリーが悪性度の高いがんや再発がんにおいて有意に上昇した。C型肝炎ウイルス感染患者の肝においてMRP2が減少していた。マクロファージにCap43遺伝子が発現していること、ならびにIFN γ によるTP/PDECGFの発現上昇にはGASエレメントが関与していた。ZD1839 (Iressa)はEGF/TGF α の誘導の血管新生因子の生産阻害、ならびに血管内皮に直接働いて血管新生に影響を与えた。

BCRPはMitoxantrone, SN-38, Topotecanなどの抗癌剤を細胞外に排出するポンプとして働くhalf molecule型ABC輸送体である。本研究で、BCRPによる抗癌剤耐性がEstrone, Estradiolにより克服されること、Estrone, EstradiolはBCRP発現細胞特異的に抗癌剤の細胞内取り込みを増大させることが明らかになった。BCRPは胎盤に高発現しており、これらのステロイドはBCRPの生理的基質であると考えられる。

NK4は癌-間質相互作用を介した癌の浸潤・転移を抑制する「癌の凍結療法」となることに加え、腫瘍血管新生を阻害することにより「癌の休眠療法」につながる。すなわち、NK4タンパク質投与、あるいはNK4遺伝子治療は「癌の凍結・休眠療法」ともいうべきものであり、NK4は従来の抗癌剤の難点を克服するとともに、血管新生阻害のみを標的とする抗癌剤を上回る新しい制癌法となることが期待される。

早期臨床試験におけるcDNAマクロアレーを用いたシグナル伝達経路の探索が可能であることが示された。R115777の生体内における標的分子はファルネシル・トランスフェラーゼであり、その最も重要なシグナル伝達経路はRhoファミリーの中の特定のサブタイプであった。

分子標的治療薬であるFlavopyridolを投与された症例においてPETによるglucoseの取り込みの低下を認めた症例を観察し得たことは、画像診断的には無効と判断された症例であっても機能的には細胞活性が低下していることが示唆された。

腫瘍マーカー値の変動は効果に関して有用な情報の一つであることが示唆されたが、画像評価SD/PD症例におけるさらなる効果の指標としての妥当性は示されなかった。

新しい生理反応を見つけ、この反応ががんでは固定化

されたものが存在し、がんの治療標的と成りうることを見出した。ヒトに適用可能な候補の薬剤を見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kanzawa, F., Koizumi, F., Koh, Y., Nakamura, T., Tatsumi, Y., Fukumoto, H., Saijo, N., Yoshioka, T. and Nishio, K. *In vitro* synergistic interactions between the cisplatin analogue nedaplatin and the DNA topoisomerase I inhibitor irinotecan and the mechanism of this interaction. *Clin. Cancer Res.*, 7: 202-209, 2001.
2. Nishio, K., Nakamura, T., Koh, Y., Kanzawa, F., Tamura, T. and Saijo, N. Oncoprotein 18 overexpression increases the sensitivity to vindesine in the human lung carcinoma cells. *Cancer*, 91(8): 1494-1499, 2001.
3. Inoue, A., Kunitoh, H., Sekine, I., Sumi, M., Tokuyue, K. and Saijo, N. Radiation pneumonitis in lung cancer patients: A retrospective study of risk factors and the long-term prognosis. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 49(3): 649-655, 2001.
4. Ohe, Y., Niho, S., Kakinuma, R., Kubota, K., Matsumoto, T., Ohmatsu, H., Goto, K., Kunitoh, H., Saijo, N. and Nishiwaki, Y. Phase I studies of cisplatin and docetaxel administered by three consecutive weekly infusions for advanced non-small cell lung cancer in elderly and non-elderly patients. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 31(3): 100-106, 2001.
5. Fujisaka, Y. and Saijo, N. Case of a patient with small-cell lung cancer treated with irinotecan plus cisplatin. *Case studies in oncology*, 3(3): 2-7, 2001.
6. Heike, Y., Kasono, K., Kunisaki, C., Hama, S., Saijo, N., Tsuruo, T., Kuntz, D.A., Rose, D.R. and Curiel, D.T. Overcoming multi-drug resistance using an intracellular anti-MDR1 sFv. *Int. J. Cancer*, 92: 115-122, 2001.

7. Kurata, T., Tamura, T., Shinkai, T., Ohe, Y., Kunitoh, H., Kodama, T., Kakiruma, R., Matsumoto, T., Kubota, K., Omatsu, H., Nishiwaki, Y. and Saijo, N. Phase I and pharmacological study of paclitaxel given over 3 h with cisplatin for advanced non-small cell lung cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 31(3): 93-99, 2001.
8. Shimizu, M., Tamura, T., Yamada, Y., Akiyama, Y., Saijo, N. and Nishio, K. CPT-11 alters the circadian rhythm of dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA in mouse liver. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92: 554-561, 2001.
9. Ohe, Y., Saijo, N. Topoisomerase I targeting agents in small-cell lung cancer. *Current Oncology Reports*, 3: 170-178, 2001.
10. Nakamura, T., Koizumi, F., Kaneko, N., Tamura, T., Chiwaki, F., Koh, Y., Akutagawa, S., Saijo, N. and Nishio, K. Reversal of cisplatin resistance by the 1,4-benzothiazepine derivative, JTV-519. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92: 597-602, 2001.
11. Sekine, I., Saijo, N. Growth-stimulating pathways in lung cancer: Implications for targets of therapy. *Clinical Lung Cancer*, 2(4): 299-306, 2001.
12. Tsunoda, T., Nakamura, T., Ishimoto, K., Yamaue, H., Tanimura, H., Saijo, N. and Nishio, K. Upregulated expression of angiogenesis genes and down regulation of cell cycle genes in human colorectal cancer tissue determined by cDNA macroarray. *Anticancer Research*, 21: 137-144, 2001.
13. Tatsumi, Y., Arioka, H., Ikeda, S., Fukumoto, H., Miyamoto, K., Fukuoka, K., Ohe, Y., Saijo, N. and Nishio, K. Enhancement of *in vivo* antitumor activity of a novel antimitotic 1-phenylpropanone derivative, AM-132, by tumor necrosis factor- α or interleukin-6. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92: 768-777, 2001.
14. Inoue, A., Saijo, N. Recent advances in the chemotherapy of non-small cell lung cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 31(7): 299-304, 2001.
15. Kunitoh, H., Akiyama, Y., Kusaba, H., Yamamoto, N., Sekine, I., Ohe, Y., Kubota, K., Tamura, T., Shinkai, T., Kodama, T., Goto, K., Niho, S., Nishiwaki, Y., Saijo, N. A phase I/II trial of cisplatin, docetaxel and ifosfamide in advanced or recurrent non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 33: 259-265, 2001.
16. Fukuoka, K., Usuda, J., Iwamoto, Y., Fukumoto, H., Nakamura, T., Yoneda, T., Narita, N., Saijo, N. and Nishio, K. Mechanisms of action of the novel sulfonamide anticancer agent E7070 on cell cycle progression in human non-small cell lung cancer cells. *Invest. New Drugs*, 19: 219-227, 2001.
17. Akiyama, Y., Ohe, Y., Tamura, T., Sawada, M., Inoue, A., Kusaba, H., Yamamoto, N., Sekine, K., Kunitoh, H., Kodama, T. and Saijo, N. A dose escalation study of paclitaxel and carboplatin in untreated Japanese patients with advanced non-small cell lung cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 31 (10): 482-487, 2001.
18. Tsuchiya, S., Ohe, Y., Sugiura, T., Fuwa, N., Kitamoto, Y., Mori, K., Kobayashi, H., Nakata, K., Sawa, T., Hirai, K., Etoh, T., Saka, H., Saito, A., Fukuda, H., Ishizuka, N. and Saijo, N. Randomized phase I study of standard-fractionated or accelerated-hyperfractionated radiotherapy with concurrent cisplatin and vindesine for unresectable non-small cell lung cancer: a report of Japan Clinical Oncology Group Study (JCOG 9601). *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 31 (10): 488-494, 2001.
19. Saijo, N., Tamura, T., Yamamoto, N., Nishio, K. New strategies for cancer therapy in 21st century. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 (Suppl 1): S102-106, 2001.

20. Yoshida, M., Feng, W., Nishio, K., Takahashi, M., Heike, Y., Saijo, N., Wakasugi, H. and Ikekawa, T. Antitumor action of the PKC activator gridimacrin through CDK2 inhibition. *Int. J. Cancer*, 94: 348-352, 2001.
21. Hotta, K., Sekine, I., Tamura, T., Sawada, M., Watanabe, H., Kusaba, H., Akiyama, Y., Inoue, A., Shimoyama, T., Nokihara, H., Ueda, Y., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Kodama, T. and Saijo, N. A phase I/II study of cisplatin and vinorelbine chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 31(12): 596-600, 2001.
22. Fukuoka, K., Arioka, H., Iwamoto, Y., Fukumoto, H., Kurokawa, H., Ishida, T., Tomonari, A., Suzuki, T., Usuda, J., Kanzawa, F., Saijo, N., and Nishio, K. Mechanism of the radiosensitization induced by vinorelbine in human non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer*, 34: 451-460, 2001.
23. Usuda, J., Okunaka, T., Furukawa, K., Tsuchida, T., Kuroiwa, Y., Ohe, Y., Saijo, N., Nishio, K., Konaka, C., and Kato, H. Increased cytotoxic effects of photodynamic therapy in IL-6 gene transfected cells via enhanced apoptosis. *Int. J. Cancer*, 93: 475-480, 2001.
24. Natsume, T., Nakamura, T., Koh, Y., Kobayashi, M., Saijo, N., and Nishio, K. Gene expression profiling of exposure to TZT-1027, a novel microtubule-interfering agent, in non-small cell lung cancer PC-14 cells and astrocytes. *Invest. New Drugs*, 19:293-301, 2001.
25. Sakai, H., Yoneda, S., Tamura, T., Nishiwaki, Y., Yokoyama, A., Watanabe, K., Saijo, N. A phase II study of paclitaxel plus cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer in Japanese patients. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 48: 499-503, 2001.
26. Sekine, I., Saijo, N. Polymorphisms of metabolizing enzymes and transporter proteins involved in the clearance of anticancer agents. *Ann. of Oncol.*, 12: 1515-1525, 2001.
27. Berront, L., Lamielle, F., Lorchel, F., Fauconnet, S., Esumi, H., Weisz, A., and Adessi, G. L. Insulin up-regulates vascular endothelial growth factor and stabilizes its messengers in endometrial adenocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 363-368, 2001.
28. Imamura, K., Ogura, T., Kishimoto, A., Kaminishi, M., and Esumi, H. Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun.*, 287: 562-567, 2001.
29. Kawasaki, H., Ogura, T., Yokose, T., Nagai, K., Nishiwaki, Y., and Esumi, H. p53 gene alteration in atypical epithelial lesions and carcinoma in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Pathol.*, 32: 1043-1049, 2001.
30. Kimura, H., Weisz, A., Ogura, T., Hitomi, Y., Kurashima, Y., Hashimoto, K., D'Acquisto, F., Makuuchi, M., and Esumi, H. Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem.*, 276: 2292-2298, 2001.
31. Nomura, S., Tatemichi, M., Kaminishi, M., and Esumi, H. A novel method for detecting single glandular intestinal metaplasia in the mucosal surface of the fixed stomach using methylene blue. *Jpn J Cancer Res.*, 92: 659-665, 2001.
32. Takamochi, K., Ogura, T., Suzuki, K., Kawasaki, H., Kurashima, Y., Yokose, T., Ochiai, A., Nagai, K., Nishiwaki, Y. and Esumi, H. Loss of heterozygosity on chromosomes 9q and 16p in

- atypical adenomatous hyperplasia concomitant with adenocarcinoma of the lung. *Am J Pathol.*, 159: 1941-1948, 2001.
33. Haga, S., Hinoshita, E., Ikezaki, K., Fukui, M., Scheffer, G. L., Uchiumi, T. and Kuwano, M. Involvement of the multidrug resistance protein 3 in drug sensitivity and its expression in human glioma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92: 211-219, 2001.
 34. Nagayama, J., Iino, M., Tada, Y., Kusaba, H., Kiue, A., Ohsima, K., Kuwano, M. and Wada, M. Retrovirus insertion and transcriptional activation of the multidrug resistance (mdr1a) gene in leukemias treated by a chemotherapeutic agent in vivo. *Blood*, 97: 759-766, 2001.
 35. Izumi, H., Imamura, T., Nagatani, G., Ise, T., Murakami, T., Uramoto, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Nomoto, M., Okamoto, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Funa, K. and Kohno, K. YB-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acid and exhibit 3'-5' exonuclease activity. *Nucl. Acids Res.*, 29: 1200-1207, 2001.
 36. Hinoshita, E., Taguchi, K., Inokuchi, A., Uchiumi, T., Kinukawa, N., Shimada, M., Tsuneyoshi, M., Sugimachi, K. and Kuwano, M. Decreased expression of an ATP-binding cassette transporter, MRP2, in human livers with hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.*, 35: 765-773, 2001.
 37. Harris, M. J., Kuwano, M., Webb, M. and Board, P. G. Identification of the apical membrane-targeting signal of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/MOAT). *J. Biol. Chem.*, 276: 20876-20881, 2001.
 38. Shibahara, K., Sugio, K., Osaki, T., Uchiumi, T., Maehara, Y., Kohno, K., Yasumoto, K., Sugimati, K. and Kuwano, M. Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small-cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 7: 3151-3155, 2001.
 39. Inokuchi, A., Hinoshita, E., Iwamoto, Y., Kohno, K., Kuwano, M. and Uchiumi, T. Enhanced expression of human multidrug resistance protein 3 by bile salt in human enterocytes: a transcriptional control of plausible bile acid transporter. *J. Biol. Chem.*, 276: 46822-46829, 2001.
 40. Goto, H., Kohno, K., Sone, S., Akiyama, S., Kuwano, M. and Ono, M. Gamma interferon-dependent induction of thymidine phosphorylase/platelet derived endothelial growth factor through gamma-activated sequence-like element in human macrophages. *Cancer Res.*, 61: 469-473, 2001.
 41. Kuwano, M., Fukushi, J., Okamoto, M., Nishie, A., Goto, H., Ishibashi, T. and Ono, M. Angiogenesis factors. *Int. Med.*, 40: 565-572, 2001.
 42. Migita, T., Oda, Y., Naito, S., Morikawa, W., Kuwano, M. and Tsuneyoshi, M. The accumulation of angiostatin-like fragments in human prostate carcinoma. *Clin Cancer Res.*, 7: 2750-2756, 2001.
 43. Minami, H., Sasaki, Y., Watanabe, T. and Ogawa, M. Pharmacodynamic Modeling of the Entire Time Course of Leucopenia after a 3-Hour Infusion of Paclitaxel. *Jpn J Cancer Res.*, 92: 220-230, 2001.
 44. Minami, H., Ohtsu, T., Fujii, H., Igarashi, T., Itoh, K., Uchiyama-Kokubu, N., Aizawa, T., Uda, Y., Tanigawara, Y., and Sasaki, Y. Phase I study of intravenous PSC-833 and Doxorubicin: Reversal of multidrug Resistance. *Jpn J Cancer Res* 92: 231-238, 2001.
 45. Minami, H., Fujii, H., Igarashi, T., Itoh, K., Tamanoi, K., Oguma, T., and Sasaki, Y. Phase I

- and Pharmacological Study of a New Camptothecin Derivative, Exatecan Metylate (DX-891f), Infused Over 30 Minutes Every Three Weeks. *Clin. Cancer Res.* 7: 3056-3064, 2001.
46. Igarashi, T., Ohtsu, T., Fujii, H., Sasaki, Y., Morishima, Y., Ogura, M., Kagami, Y., Kinoshita, T., Kasai, M., Kiyama, Y., Kobayashi, Y., Tobinai, K. and Members of the IDEC-C2B8 Group. Re-treatment of relapsed indolent B-cell lymphoma with rituximab. *Int J Hematol* 73: 213-221, 2001.
 47. Tamura, T. New State of the art in small-cell lung cancer. *Oncology*, 15(1): 8-10, 2001.
 48. Takama, H., Tanaka, H., Sudo, T., Tamura, T., Tanigawara, Y. Population Pharmacokinetic Modeling and Model Validation of Spic amycin Derivative, KRN5500, in Phase I Study. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 47(5): 404-410, 2001.
 49. Zhang, J., Takahashi, K., Takahashi, F., Shimizu, K., Ohshita, F., Kameda, Y., Nishio, K., Fukuchi, Y. Differential osteopontin expression in lung cancer. *Cancer Lett.*, 171: 215-222, 2001.
 50. Yoshida, M., Suzuki, T., Komiya, J., Hatashita, E., Nishio, K., Nakagawa, K., Fukuoka, M. Induction of MRP5 and SMRP mRNA by adriamycin-exposure and its overexpression in human lung cancer cells resistant to adriamycin. *Int. J. Cancer*, 94: 432-437, 2001.
 51. Suzuki, T., Nishio, K., Tanabe, S. The MRP family and anticancer drug metabolism current drug. *Met. Curr. Drug Met.*, 2: 367-377, 2001.
 52. Matsumoto, K., Nakamura, T. HGF-c-Met receptor pathway in tumor invasion-metastasis and potential cancer treatment with NK4. In "Growth Factors and Their Receptors in Cancer Metastasis" (eds, Jiang, W.G., Matsumoto, K., Nakamura, T.), Kluwer Academic Publisher, pp. 241-276, 2001.
 53. Matsumoto, K., Yoshitomi, H., Rossant, J., Zaret, K. Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science*, 294: 559-563, 2001.
 54. Beppu, K., Uchiyama, A., Morisaki, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Tanaka, M., Katano, M. Hepatocyte growth factor production by peripheral blood mononuclear cells of recurrent cancer patients. *Anticancer Res.*, 21: 2195-2200, 2001.
 55. Parr, C., Davies, G., Nakamura, T., Matsumoto, K., Mason, M.D., Jiang, W.G. The HGF/SF-induced phosphorylation of paxillin, matrix adhesion, and invasion of prostate cancer cells were suppressed by NK4, an HGF/SF variant. *Biochem Biophys Res Commun.*, 285: 1330-1337, 2001.
 56. Tomioka, D., Maehara, N., Kuba, K., Mizumoto, K., Tanaka, M., Matsumoto, K., Nakamura, T. Inhibition of growth, invasion, and metastasis of human pancreatic carcinoma cells by NK4 in an orthotopic mouse model. *Cancer Res.*, 61: 7518-7524, 2001.
 57. Maehara, N., Matsumoto, K., Kuba, K., Mizumoto, K., Tanaka, M., Nakamura, T. NK4, a four-kringle antagonist of HGF, inhibits spreading and invasion of human pancreatic cancer cells. *Br. J. Cancer*, 84: 864-873, 2001.
 58. Furuse, K., Kawahara, M., Hasegawa, K., Kudoh, S., Takada, M., Sugiura, T., Ichinose, Y., Fukuoka, M., Ohashi, Y., Niitani, H. Early phase II study of S-1, a new oral fluoropyrimidine, for advanced non-small-cell lung cancer. *Int J Clin Oncol*, 6(5): 236-41, 2001.
 59. Takeda, K., Negoro, S., Takifuji, N., Nitta, T., Yoshimura, N., Terakawa, K., Fukuoka, M. Dose escalation study of irinotecan combined with carboplatin for advanced non-small-cell lung

- cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 48(2): 104-8, 2001.
60. Matsui, K., Masuda, N., Yana, T., Takada, Y., Kobayashi, M., Nitta, T., Hirashima, T., Fukuoka, M. Carboplatin calculated with Chatelut's formula plus etoposide for elderly patients with small-cell lung cancer. *Intern Med*, 40(7): 603-6, 2001.
61. Fukuoka, M. Role of topoisomerase I inhibitors in small-cell lung cancer. *Oncology (Huntingt)*, 15(7 Suppl 8): 9-13, 2001.
62. Fukuoka, M. State of the art of non-small-cell lung cancer in the new millennium. *Oncology (Huntingt)*, 15(3 Suppl 6): 9-11, 2001.
63. Fukuoka, M. Current status of irinotecan in lung cancer. *Oncology (Huntingt)*, 15(1 Suppl 1): 6-7, 2001.
64. Noda, K., Nishiwaki, Y., Kawahara, M., Negoro, S., Sugiura, T., Yokoyama, A., Fukuoka, M., Mori, K., Watanabe, K., Tamura, T., Yamamoto, S., Saijo, N. for the Members of the Japan Clinical Oncology Group. Irinotecan plus cisplatin as compared with etoposide plus cisplatin for extensive small-cell lung cancer. *N. Eng. J. Med*, 346(2): 85-91, 2002.
65. Naruse, I., Ohmori, T., Ao, Y., Fukumoto, H., Kuroki, T., Mori, M., Saijo, N. and Nishio, K. Antitumor activity of the selective epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) Iressa® (ZD1839) in an EGFR-expressing multidrug resistant cell line *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Cancer*, 98: 310-315, 2002.
66. Natsume, T., Koh, Y., Kobayashi, M., Fukumoto, H., Takahashi, F., Nakamura, T., Ohe, Y., Saijo, N. and Nishio, K. Enhanced antitumor activities of TZT-1027 against TNF- α or IL-6 secreting Lewis lung carcinoma *in vivo*. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 49: 35-47, 2002.
67. Inomata, M., Kaneko, A., Kurimoto, T., Saijo, N. In vitro thermo- and thermochemo-sensitivity of retinoblastoma cells from surgical specimens. *Int. J. Hyperthermia*, 18: 50-61, 2002.
68. Kusaba, H., Tamura, T., Shimoyama, T., Hotta K., Inoue, A., Nokihara, H., Ueda, Y., Akiyama, Y., Yamamoto, N., Sekine, I., Kunitoh, H., Ohe, Yuichiro, Kodama, T. and Saijo, N. Phase I/II study of 3-week cycle cisplatin-gemcitabine in advanced non-small cell lung cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 32(2): 43-47, 2002.
69. Koh, Y., Tsunoda, T., Iwahashi, M., Yamaue, H., Ishimoto, K., Tanimura, H., Fukumoto, H., Nakamura, T., Tatsumi, Y., Shimizu, M., Saijo, N. and Nishio, K. Decreased expression of α 2,8 sialyltransferase and increased expression of β 1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase in gastrointestinal cancers. *Exp. Biol. Med.*, 227(3): 196-200, 2002.
70. Hashimoto, K., Kato, K., Imamura, K., Kishimoto, A., Yoshikawa, H., Taketani, Y., and Esumi, H. 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside confers strong tolerance to glucose starvation in a 5'-AMP-activated protein kinase-dependent fashion. *Biochem Biophys Res Commun.*, 290: 263-267, 2002.
71. Hirano, K., Yamashita, K., Yamashita, N., Nakatsumi, Y., Esumi, H., Kawashima, A., Ohta, T., Mai, M., and Minamoto, T. Non-Hodgkin's lymphoma in a patient with probable hereditary nonpolyposis colon cancer: report of a case and review of the literature. *Dis Colon Rectum.*, 45: 273-279, 2002.
72. Kage, K., Tsukahara, S., Sugiyama, T., Asada, S., Ishikawa, E, Tsuruo, T., and Sugimoto, Y. Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through

- the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int. J. Cancer*, 97: 626-630, 2002.
73. Takahashi, F., Akutagawa, S., Fukumoto, H., Tsukiyama, S., Ohe, Y., Takahashi, K., Fukuchi, Y., Saijo, N., Nishio, K. Osteopontin induces angiogenesis of murine neuroblastoma cells in mice. *Int. J. Cancer*, 98: 707-712, 2002.
74. Koh, Y., Nishio, K., Saijo, N. Mechanisms of action of cancer chemotherapeutic agents: topoisomerase inhibitors. In "Cancer Handbook" Reference Nature Publishing Group, Crinan Street, London, UK. Chap. 84C: 1313-1322, 2002.
75. Maemondo, M., Narumi, K., Saijo, Y., Usui, K., Yahara, M., Tazawa, R., Hagiwara, K., Matsumoto, K., Nakamura, T., Nukiwa, T.: Targeting angiogenesis and HGF function using an adenoviral vector expressing the HGF-antagonist NK4 for cancer therapy. *Mol. Therapy*, 5, 177-185, 2002.
76. Tsurutani, J., Komiya, T., Uejima H., Tada H., Negoro S., Oka M., Kohno S., Fukuoka M., Nakagawa, K. Mutation analysis of the beta-tubulin gene in lung cancer. *Lung Cancer*, (*In press*)
77. Tsurutani, J., Niita T., Hirashima, T., Komiya T., Uejima H., Tada, H., Negoro, S., Tohda, Y., Fukuoka M., Nakagawa, K. Point mutations in the topoisomerase I gene in patients with non-small cell lung cancer treated with irinotecan. *Lung Cancer*, (*in press*)
78. Okamoto, M., Ono, M., Uchiyama, T., Ueno, H., Kohno, K., Sugimachi, K. and Kuwano, M. Up-regulation of thrombospondin-1 gene by epidermal growth factor and transforming growth factor β in human cancer cells-transcriptional activation and messenger RNA stabilization. *Biochim. Biophys. Acta.*, 93595: (*In press*)
79. Hirata, T., Ogawa, S., Kometani, T., Kuwano, T., Naito, S., Kuwano, M. and Ono, M. ZD1839 ('Iressa') induces antiangiogenic effects through inhibition of EGFR tyrosine kinase. *Cancer Res.*, (*In press*)
80. Itokawa, T., Nokihara, H., Nishioka, Y., Sone, S., Iwamoto, Y., Yamada, Y., Cherrington, J., McMahon, G., Shibuya, M., Kuwano, M. and Ono, M. Antiangiogenic effect by SU5416 is partly due to inhibition of Flt-1 receptor signaling. *Molec. Cancer Therapeutics*, (*In press*)
81. Imai, Y., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., and Sugimoto, Y. Estrone and 17 β -estradiol reverse breast cancer resistance protein-mediated multidrug resistance. *Jpn. J. Cancer Res.*, (*In press*)
82. Sugimoto, Y., Tsuruo, T., Pastan, I., and Gottesman, M. M. Bicistronic retrovirus vectors encoding drug-resistant genes. In: R. A. Aubin (ed.), *Transgene Delivery and Expression in Mammalian Cells* (a volume of *Methods in Molecular Biology*) Humana Press, (*In press*)
83. Naruse, I., Fukumoto, H., Saijo, N., Nishio, K. Enhanced anti-tumor effect of trastuzumab in combination with cisplatin. (*In press*)
84. Fukuoka, K., Arioka, H., Iwamoto, Y., Fukumoto, H., Kurokawa, H., Ishida, T., Tomonari, A., Suzuki, T., Usuda, J., Kanzawa, F., Kimura, H., Saijo, N., Nishio, K. Mechanism of vinorelbine-induced radiosensitization of human small cell lung cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, (*In press*)
85. Kanzawa, F., Akiyama, Y., Saijo, N., Nishio, K. *In vitro* effects of combinations of cisplatin (ZD0473) with other novel anticancer drugs on the growth of SBC-3, a human small cell lung cancer cell line. *Lung Cancer*, (*In press*)

新しいがん薬物療法の研究
分担研究課題 分子化学療法による進行がんの制御に関する研究

分担研究者 西條長宏 国立がんセンター中央病院 部長

研究要旨：胸部放射線療法（TRT）と同時併用する cisplatin（C）、vinorelbine（V）の最大耐用投与量（MTD）と第II相試験への推奨投与量（RD）を決定することを目的とした。PS 0-1、年齢74歳以下、悪性胸水、心嚢水を伴わない切除不能III期非小細胞肺癌を対象に、C（80mg/m², day 1）とV（days 1 & 8）を4週間毎に4 cycle 投与した。V投与量（mg/m²）を20（level 1）、25（level 2）と増量し、MTDに達しなければさらに mitomycin-C（8mg/m², day 1）を追加した上でV投与量を15、20、25と増量する計画とした。TRTは60Gy/30分割で、30Gy終了時に4日間の休止期間を設けた。投与量規定毒性（DLT）は、4日以上持続する、又は発熱性の grade（G）4 好中球減少、G4の白血球減少、血小板数 2万未満、脱毛、悪心、嘔吐を除く G3以上の非血液毒性、及び患者の治療継続拒否とした。1 level 当たり 6-12 例を予定し、DLTの頻度が1/3を越えた投与量を MTD とした。1999年10月～2000年8月に、level 1に13例、level 2に5例の症例集積を得た。男性16例、女性2例、年齢中央値59（48-69）歳、病期 IIIA9例、IIIB9例、腺癌14例、扁平上皮癌3例、腺扁平上皮癌1例であった。14例（78%）が化療4 cycleを、15例（83%）がTRT 60Gyを完遂した。Level 1, 2においては G4 白血球減少と好中球減少の頻度は、共にそれぞれ77%と100%であった。G3-4の血小板減少は認められなかった。G3-4の非血液毒性は、level 1では肝機能障害（8%）、低Na血症（8%）、感染（38%）、level 2では感染（60%）であった。食道炎と肺障害は軽度であった。DLTの頻度は、level 1で33%、level 2で60%であった。部分寛解は15/18例（83%）に認められた。MTDはlevel 2、RDはlevel 1と考えられた。

A. 研究目的

III期非小細胞がん（NSCLC）に対する標準的治療は胸部放射線治療（RT）と化学療法（CT）の合併療法と考えられている。またRTとCTを同時併用することにより治療成績の向上が期待されている。近年NSCLCに対し有効な新抗がん剤が開発されてきたが新抗がん剤とプラチナを含む併用化学療法とRTの至適合併療法についてのコンセンサスはない。新抗がん剤中CPT-11とgemcitabineについては肺毒性の問題がありRTとの同時併用は困難である。本研究ではcisplatin（C）、vinorelbine（V）と胸部放射線同時併用療法の毒性を評価し最大耐用投与量を決定する事を目的とした。

B. 研究方法

【症例の選択基準】

適格条件

- 1) 組織診または細胞診で非小細胞肺癌と診断された症例。
- 2) 切除不能な臨床病期 IIIA または IIIB 期で根治照射可能と考えられる症例。
- 3) 前治療（手術、放射線療法、化学療法を含む）のない症例。
- 4) 抗腫瘍効果を観察するための評価可能病変を持つ症例。
- 5) 照射野が一側肺の1/2を越えない症例。
- 6) 20歳以上74歳以下の症例。
- 7) Performance Status（ECOGの基準）が0-1の症例。
- 8) 適当な骨髄、肝、腎、肺機能が保持されている症例。【 a) $12000/\mu\text{l} \geq \text{WBC} \geq 4000/\mu\text{l}$ 、 $\text{Neu} \geq 2000/\mu\text{l}$ 、 $\text{Hb} \geq 10.0\text{g/dl}$ 、 $\text{PLT} \geq 100,000/\mu\text{l}$; b) $\text{T-Bil} \leq 1.5\text{mg/dl}$ 、 GOT 、 GPT

≤2x normal value; c) CRN ≤1.5mg/dl, Ccr ≥60ml/min; d) PaO₂ ≥70Torr (room air)]

9) informed consent が得られた症例。

除外条件

- 1) 悪性胸水、または悪性心嚢水陽性症例。
- 2) 活動性重複癌を有する症例。
- 3) 重篤な合併症をもつ症例。【 a) コントロール不良の狭心症、3ヶ月以内の心筋梗塞、心不全などの重篤な心疾患; b) 治療によってもコントロール困難な糖尿病、高血圧; c) 胸部単純写真で判明する間質性肺炎または肺線維症。胸部放射線療法の施行が困難と判断される肺気腫、慢性気管支炎、気管支喘息などの肺疾患; d) 治療に支障を来すと判断される感染症; e) そのほか治療の施行に重大な支障をきたすと判断される合併症】
- 4) 妊娠中あるいは授乳中の女性。

【試験デザイン】 Combination phase I study

【治療方法】

1. 抗癌剤の投与方法と投与スケジュール

シスプラチンは第1日目に、ピノレルピンは第1、8日目に投与する。設定投与量レベル3以上ではマイトマイシンを第1日目に投与する。4週間を1コースとし、計4コース投与する。3コース目以降は胸部放射線療法が終了してから行う。胸部放射線療法は第2日目から開始し、1日1回、週5日間行い、第4週目(第21-29日目)には休止期間を設ける。化学療法2コース第2日目から再開し、計30回照射する。

2. 設定投与量レベル

投与量レベル	シスプラチン (mg/m ²)	ピノレルピン (mg/m ²)
-1	80	15
1	80	20

3. Dose limiting toxicity (DLT) の定義

- 1) 4日以上持続する、又は38℃以上の発熱または感染症を伴う grade 4 の好中球減少、
- 2) Grade 4 の白血球減少、
- 3) 血小板数 < 20,000/μl、
- 4) 脱毛、悪心、嘔吐を除く grade 3 以上の非血液毒性、
- 5) 本治療の継続を患者が拒否した場合

4. 投与量の増量基準と MTD の設定

各 dose level において、6 症例ずつ検討する。化学療法2コース投与期間中または胸部放射線療

法施行期間中における DLT の発現頻度により、次のように投与量の増量又は中止を行う。ただし、化学療法 3-4 コース投与期間中および全治療終了後の晩期毒性も同様に評価し、dose level 設定の際の参考とする。・6 例中 DLT が 0-1 例の場合は、次の dose level に進む。・6 例中 DLT が 2 例に認められた場合は、さらに 6 例を追加する。この 12 例中 DLT を認めた症例が 4 例以下の場合には、次の dose level に進む。5 例以上認められた場合には、その投与量を MTD とする。・6 例中 DLT が 3 例以上に認められた場合は、その投与量を MTD とする。・第 II 相試験への推奨投与量を決定し、その投与量で 6-15 例追加して、DLT の発現頻度が 1/3 を越えないことを確認する。

【目標症例数、症例集積期間】

各レベル 6-12 例、推奨投与量で 6-15 例追加、症例集積期間を 2 年を予定した。

C. 研究結果

登録状況

Level 1	13
Level 2	5
計	18

症例の背景因子と治療法の群分け

(解析対象 18 例)

【性別】	female	2
	male	16
【年齢】	median (range)	59 (48-69) 歳
【病期】	IIIA	9
	IIIB	11
【病理組織】	Adenocarcinoma	14
	Squamous cell carcinoma	3
	Adenosquamous carcinoma	1
【照射面積 (cm ²)】	median (range)	189 (128-529)

治療経過要約 (解析対象 18 例)

【治療コース数】		症例数	(%)
Level 1	4 コース	10	(77)
	2 コース	2	(15)
	1 コース	1	(8)
Level 2	4 コース	4	(80)
	3 コース	1	(20)
【治療スキップ】	回	症例数	(%)
Level 1	0	9	(69)
	1	4	(31)

Level 2	0	2	(40)
	1	2	(40)
	3	1	(20)

【胸部放射線療法】

60 Gy	15	(83)
< 60 Gy	3	(17)

【毒性】

14 例はプロトコール規定通りの治療が可能であった。有害事象による治療中止を 2 例に認めた。Grade 3/4 の白血球減少、顆粒球減少をレベル 1 では、それぞれ 9 例 (69%)、9 例 (69%)、レベル 2 では 4 例 (80%)、4 例 (80%) に認めた。非血液毒性では grade 3/4 の感染レベルで 5 例 (38%)、レベル 2 で 3 例 (60%) に認めた。他の毒性は殆ど認められなかった。レベル 1 では DLT を 4 例 (33%)、レベル 2 では 3 例 (60%) に認めた。

抗腫瘍効果 (解析対象 18 例)

		(%)
CR	0	(0)
PR	15	(83)
NC	1	(6)
PD	1	(6)
NE	1	
RR	83%	

D. 考察, E. 結論

Level 1 では、およそ 70% の症例でプロトコール規定の治療が完遂でき、放射線療法の遅延も 5 日以内であった。毒性については、grade 3-4 の好中球減少を 77% に、grade 3-4 の感染を 38% に、DLT を 33% に認めた。Level 2 では 60% の症例で化学療法のスキップを要し、40% の症例で放射線療法の遅延が 6 日以上であった。毒性については、grade 3-4 の好中球減少を 100% に、grade 3-4 の感染を 60% に、DLT を 60% に認めた。DLT を認めた 6 例中、感染源を特定できない発熱性好中球減少を 5 例に、肺炎を 1 例に、肝機能障害を 1 例に認めた。食道炎と肺障害は、どちらも軽度であった。治療関連死は認められなかった。抗腫瘍効果については、PR を 18 例中 15 (83%) に認めた。以上より、MTD は level 2 で、第 II 相試験のための推奨投与量は level 1 と考えられた。

F. 発表論文

1) Kanzawa, F., Koizumi, F., Koh, Y.,

Nakamura, T., Tatsumi, Y., Fukumoto, H., Saijo, N., Yoshioka, T. and Nishio, K. *In vitro* synergistic interactions between the cisplatin analogue nedaplatin and the DNA topoisomerase I inhibitor irinotecan and the mechanism of this interaction. *Clin. Cancer Res.*, 7: 202-209, 2001

- 2) Nishio, K., Nakamura, T., Koh, Y., Kanzawa, F., Tamura, T. and Saijo, N. Oncoprotein 18 overexpression increases the sensitivity to vindesine in the human lung carcinoma cells. *Cancer*, 91(8): 1494-1499, 2001
- 3) Inoue, A., Kunitoh, H., Sekine, I., Sumi, M., Tokuyue, K. and Saijo, N. Radiation pneumonitis in lung cancer patients: A retrospective study of risk factors and the long-term prognosis. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.*, 49(3): 649-655, 2001
- 4) Ohe, Y., Niho, S., Kakinuma, R., Kubota, K., Matsumoto, T., Ohmatsu, H., Goto, K., Kunitoh, H., Saijo, N. and Nishiwaki, Y. Phase I studies of cisplatin and docetaxel and administered by three consecutive weekly infusions for advanced non-small cell lung cancer in elderly and non-elderly patients. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 31(3): 100-106, 2001
- 5) Fujisaka, Y. and Saijo, N. Case of a patient with small-cell lung cancer treated with irinotecan plus cisplatin. *Case studies Oncol.*, 3(3): 2-7, 2001
- 6) Heike, Y., Kasono, K., Kunisaki, C., Hama, S., Saijo, N., Tsuruo, T., Kuntz, D.A., Rose, D.R. and Curiel, D.T. Overcoming multi-drug resistance using an intracellular anti-MDR1 sFv. *Int. J. Cancer*, 92: 115-122, 2001
- 7) Kurata, T., Tamura, T., Shinkai, T., Ohe, Y., Kunitoh, H., Kodama, T., Kakinuma, R.,

- Matsumoto, T., Kubota, K., Omatsu, H., Nishiwaki, Y. and Saijo, N. Phase I and pharmacological study of paclitaxel given over 3 h with cisplatin for advanced non-small cell lung cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 31(3): 93-99, 2001
- 8) Shimizu, M., Tamura, T., Yamada, Y., Akiyama, Y., Saijo, N. and Nishio, K. CPT-11 alters the circadian rhythm of dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA in mouse liver. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92: 554-561, 2001
- 9) Ohe, Y., Saijo, N. Topoisomerase I targeting agents in small-cell lung cancer *Current Oncol. Rep.*, 3: 170-178, 2001
- 10) Nakamura, T., Koizumi, F., Kaneko, N., Tamura, T., Chiwaki, F., Koh, Y., Akutagawa, S., Saijo, N. and Nishio, K. Reversal of cisplatin resistance by the 1,4-benzothiazepine derivative, JTV-519. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92: 597-602, 2001
- 11) Sekine, I., Saijo, N. Growth-stimulating pathways in lung cancer: Implications for targets of therapy. *Clin. Lung Cancer*, 2(4): 299-306, 2001
- 12) Tsunoda, T., Nakamura, T., Ishimoto, K., Yamaue, H., Tanimura, H., Saijo, N. and Nishio, K. Upregulated expression of angiogenesis genes and down regulation of cell cycle genes in human colorectal cancer tissue determined by cDNA macroarray. *Anticancer Res.*, 21: 137-144, 2001
- 13) Tatsumi, Y., Arioka, H., Ikeda, S., Fukumoto, H., Miyamoto, K., Fukuoka, K., Ohe, Y., Saijo, N. and Nishio, K. Enhancement of *in vivo* antitumor activity of a novel antimetabolic 1-phenylpropenone derivative, AM-132, by tumor necrosis factor- α or interleukin-6. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92: 768-777, 2001
- 14) Inoue, A., Saijo, N. Recent advances in the chemotherapy of non-small cell lung cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 31(7): 299-304, 2001
- 15) Kunitoh, H., Akiyama, Y., Kusaba, H., Yamamoto, N., Sekine, I., Ohe, Y., Kubota, K., Tamura, T., Shinkai, T., Kodama, T., Goto, K., Niho, S., Nishiwaki, Y., Saijo, N. A phase I/II trial of cisplatin, docetaxel and ifosfamide in advanced or recurrent non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 33: 259-265, 2001
- 16) Fukuoka, K., Usuda, J., Iwamoto, Y., Fukumoto, H., Nakamura, T., Yoneda, T., Narita, N., Saijo, N. and Nishio, K. Mechanisms of action of the novel sulfonamide anticancer agent E7070 on cell cycle progression in human non-small cell lung cancer cells. *Invest. New Drugs*, 19: 219-227, 2001
- 17) Akiyama, Y., Ohe, Y., Tamura, T., Sawada, M., Inoue, A., Kusaba, H., Yamamoto, N., Sekine, K., Kunitoh, H., Kodama, T. and Saijo, N. A dose escalation study of paclitaxel and carboplatin in untreated Japanese patients with advanced non-small cell lung cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 31 (10): 482-487, 2001
- 18) Tsuchiya, S., Ohe, Y., Sugiura, T., Fuwa, N., Kitamoto, Y., Mori, K., Kobayashi, H., Nakata, K., Sawa, T., Hirai, K., Etoh, T., Saka, H., Saito, A., Fukuda, H., Ishizuka, N. and Saijo, N. Randomized phase I study of standard-fractionated or accelerated-hyperfractionated radiotherapy with concurrent cisplatin and vindesine for unresectable non-small cell lung cancer: a report of Japan Clinical Oncology Group Study (JCOG 9601). *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 31 (10): 488-494, 2001

- 19) Saijo, N., Tamura, T., Yamamoto, N., Nishio, K. New strategies for cancer therapy in 21st century. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 (Suppl 1): S102-106, 2001
- 20) Yoshida, M., Feng, W., Nishio, K., Takahashi, M., Heike, Y., Saijo, N., Wakasugi, H. and Ikekawa, T. Antitumor action of the PKC activator gnidimacrin through CDK2 inhibition. *Int. J. Cancer*, 94: 348-352, 2001
- 21) Hotta, K., Sekine, I., Tamura, T., Sawada, M., Watanabe, H., Kusaba, H., Akiyama, Y., Inoue, A., Shimoyama, T., Nokihara, H., Ueda, Y., Yamamoto, N., Kunitoh, H., Ohe, Y., Kodama, T. and Saijo, N. A phase I/II study of cisplatin and vinorelbine chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 31(12): 596-600, 2001
- 22) Fukuoka, K., Arioka, H., Iwamoto, Y., Fukumoto, H., Kurokawa, H., Ishida, T., Tomonari, A., Suzuki, T., Usuda, J., Kanzawa, F., Saijo, N., and Nishio, K. Mechanism of the radiosensitization induced by vinorelbine in human non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer*, 34: 451-460, 2001
- 23) Usuda, J., Okunaka, T., Furukawa, K., Tsuchida, T., Kuroiwa, Y., Ohe, Y., Saijo, N., Nishio, K., Konaka, C., and Kato, H. Increased cytotoxic effects of photodynamic therapy in IL-6 gene transfected cells via enhanced apoptosis. *Int. J. Cancer*, 93: 475-480, 2001
- 24) Natsume, T., Nakamura, T., Koh, Y., Kobayashi, M., Saijo, N., and Nishio, K. Gene expression profiling of exposure to TZT-1027, a novel microtubule-interfering agent, in non-small cell lung cancer PC-14 cells and astrocytes. *Invest. New Drugs*, 19:293-301, 2001
- 25) Sakai, H., Yoneda, S., Tamura, T., Nishiwaki, Y., Yokoyama, A., Watanabe, K., Saijo, N. A phase II study of paclitaxel plus cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer in Japanese patients. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 48: 499-503, 2001
- 26) Sekine, I., Saijo, N. Polymorphisms of metabolizing enzymes and transporter proteins involved in the clearance of anticancer agents. *Ann. of Oncol.*, 12: 1515-1525, 2001.